

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. Jürgen Schölmerich
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Die neuen Anti-Glykan-Serumantikörper Anti-Mannobiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (AMCA), Anti-Laminaribiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (ALCA), Anti-Chitobiosid Carbohydrat IgA-Antikörper (ACCA), Anti-Laminarin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-L) und Anti-Chitin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-C), sowie Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (gASCA) in Verbindung mit perinukleären antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (pANCA) erleichtern die Diagnose und Differenzierung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stephan Schleder
2010

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin I
Direktor: Prof. Dr. Jürgen Schölmerich
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Die neuen Anti-Glykan-Serumantikörper Anti-Mannobiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (AMCA), Anti-Laminaribiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (ALCA), Anti-Chitobiosid Carbohydrat IgA-Antikörper (ACCA), Anti-Laminarin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-L) und Anti-Chitin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-C), sowie Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (gASCA) in Verbindung mit perinukleären antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (pANCA) erleichtern die Diagnose und Differenzierung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stephan Schleder
2010

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. Frank Klebl

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Feuerbach

Tag der mündlichen Prüfung:

23.08.2010

„Für meine Eltern“

1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	3
2.1.1	Historisches.....	3
2.1.2	Epidemiologie.....	3
2.1.3	Ätiologie und Pathogenese.....	4
2.1.3.1	Umweltbedingte Faktoren	4
2.1.3.2	Genetische Faktoren.....	5
2.1.3.3	Immunologische Faktoren und Darmflora	8
2.1.4	Diagnostik und Differenzierung	10
2.1.4.1	Klinik und diagnostische Methoden.....	10
2.1.4.2	Pathologie und Verlauf.....	12
2.1.4.3	Extraintestinale Manifestationen	15
2.1.4.4	Probleme bei der Diagnose und Differenzierung	16
2.2	Vorkommen verschiedener Antikörper bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	18
2.2.1	Antikörper gegen perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (pANCA)	19
2.2.2	Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (ASCA)	20
2.2.3	Wertigkeit der Kombination von Anti-Saccharomyces cerevisiae- Antikörper (ASCA) und perinukleären antineutrophilen zytoplasmatische Antikörpern (pANCA) in der Differentialdiagnose der CED	21
2.2.4	Antikörper gegen exokrines Pankreas (PAB)	22

2.2.5	Antikörper gegen bakterielle Oberflächenproteine: anti- cBir1, anti-OmpC und anti-I2.....	23
2.2.6	Vorkommen neuer Antikörper: Anti-Mannobiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (AMCA), Anti-Laminaribiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (ALCA) und Anti-Chitobiosid Carbohydrat IgA-Antikörper (ACCA), sowie Anti-Laminarin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-L) und Anti-Chitin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-C)	25
2.3	Aufgaben- und Fragestellung dieser Arbeit.....	26
3	Patienten, Material und Methoden	28
3.1	Patienten.....	28
3.1.1	Probandenkollektiv	28
3.1.2	Aufstellung der zu analysierenden Kohorte	30
3.1.3	Kompetenznetz CED – Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa	31
3.1.4	Aufstellung der Kontroll-Kohorte.....	31
3.1.4.1	Probensammlung der Kontrollkohorte.....	31
3.1.4.2	Probenverarbeitung der Kontrollkohorte	32
3.2	Erhebung der klinischen Daten	33
3.2.1	Daten der zu analysierenden Kohorte	33
3.2.2	Daten der Kontroll-Kohorte	34
3.2.3	Datenaufnahme und -verarbeitung.....	34
3.3	Technik der Bestimmungen	40
3.3.1	Probenversand	40

3.3.2	Bestimmung der Anti-Glykan-Serumantikörper	40
3.3.3	Bestimmung von pANCA.....	42
3.3.4	Genauigkeitsanalyse und cut-off Werte.....	43
3.4	Auswertung und Statistik.....	44
4	Ergebnisse	46
4.1	Prävalenz der Serumantikörper	47
4.2	Wertigkeit der Serumantikörper	49
4.2.1	ROC-Kurven mit AUC der Marker	49
4.2.2	Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW	51
4.3	Ergebnisse bei Kombination der Serumantikörper	53
4.4	Verhalten der Anti-Glykan-Serumantikörper im zeitlichen Verlauf ..	54
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	56
5	Diskussion.....	58
5.1	Ergebnisse im Überblick	58
5.2	Ergebnisse im Vergleich mit ähnlichen aktuellen Forschungen	58
5.3	Bedeutung der Ergebnisse für die diagnostischen Möglichkeiten ...	60
5.3.1	Differentialdiagnose MC vs. CU.....	60
5.3.2	Differentialdiagnose MC vs. Kein MC	61
5.4	Verlaufskonstanz der Marker	62
5.5	Umsetzbarkeit der Ergebnisse im klinischen Routinebetrieb	63
5.6	Einschränkungen	64
5.7	Ausblick.....	65

6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis.....	69
8	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	83
8.1	113. Kongress der DGIM 2007	83
8.2	115. Kongress der DGIM 2009	83
8.3	Veröffentlichungen	84
9	Danksagung	85
	Lebenslauf	87
	Eidesstattliche Erklärung	90

1 Abkürzungsverzeichnis

ACCA	Anti-Chitobiosid Carbohydrat IgA-Antikörper
ALCA	Anti-Laminaribiosid Carbohydrat IgG-Antikörper
AMCA	Anti-Mannobiosid Carbohydrat IgG-Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
Anti-L	Anti-Laminarin Carbohydrat IgA-Antikörper
Anti-C	Anti-Chitin Carbohydrat IgA-Antikörper
ASCA	Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper
gASCA	Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (nach Bestimmung der Firma Glycominds Ltd., Lod, Israel)
CARD-15	Caspase recruitment domain 15
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CDAI	Crohn´s disease activity index
CI	Colitis indeterminata
CU	Colitis ulcerosa
DGIM	Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin
EIM	Extraintestinale Manifestationen
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GI	Probandenkollektiv mit anderer gastrointestinaler Erkrankung als CED
HLA	Human leukocyte antigene
IBD	Inflammatory bowel disease

IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IEZ	Intestinale Epithelzellen
IFA	Immunfluoreszenz-Assay
IL	Interleukin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KO	Kontrollkollektiv ohne gastrointestinale Erkrankung
LPL	In der Lamina propria gelegene Lymphozyten
MC	Morbus Crohn
MUC-3	Epitheliales Muzin 3
MW	Mittelwert
NOD-2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
NPW	Negativ prädiktiver Wert
PAB	Antikörper gegen exokrines Pankreas
pANCA	Perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
PPW	Positiv prädiktiver Wert
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
P25	25. Perzentile
P75	75. Perzentile
Rpm	Rounds per minute
SD	Standardabweichung
TGF β	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like-receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α

2 Einleitung

2.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

2.1.1 Historisches

Die Erkrankung, die uns heute als Morbus Crohn bekannt ist, wurde erstmals 1932 durch B.B. Crohn, L. Ginsburg und G.D. Oppenheimer vom Mount Sinai Hospital in New York unter der Bezeichnung „Ileitis regionalis“ bzw. „Ileitis terminalis“ beschrieben (1).

Der Begriff „Colitis ulcerosa“ wurde dagegen bereits 1859 vom Pathologen Samuel Wilks aus London eingeführt. Er beobachtete damals am Dickdarm von Patienten Veränderungen in Form entzündlicher Rötungen sowie zahlreicher Ulzerationen (2).

2.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des **Morbus Crohn** (MC) liegt hierzulande bei etwa 5,6/100000, während die Prävalenz mit bis zu 150/100000 angegeben wird. Bei der **Colitis ulcerosa** (CU) finden sich Inzidenzen von 3-4/100000 bei einer Prävalenz von etwa 100/100000 (3) (4).

Bei den CED handelt es sich um weltweit auftretende Erkrankungen, mit jedoch einer geographisch sehr unterschiedlichen Verteilung:

Während in den großen Industrienationen wie den USA, Deutschland und auch in Skandinavien hohe Prävalenzen gefunden werden, ergibt sich ein deutlich selteneres Auftreten in Asien und Südamerika.

Außerdem beobachtet man ein gehäuftes Vorkommen in der städtischen verglichen mit der ländlichen Bevölkerung sowie in höheren sozioökonomischen Schichten verglichen mit der einkommensschwächeren Bevölkerung (3) (5).

Die Neuerkrankungsrate nimmt stetig zu, wobei es typischerweise bei den CED zu zwei Manifestationsgipfeln kommt: Der erste zwischen dem 15. und 30., der zweite zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr (3) (5).

Es ergibt sich weiterhin eine gleichmäßige Verteilung auf die beiden Geschlechter, ebenso wie eine familiäre Häufung, auf die im Folgenden noch eingegangen werden wird (6) (7).

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese des MC sowie der CU sind nicht vollständig geklärt. Es gilt jedoch als erwiesen, dass es sich um multifaktorielle, polygenetische Erkrankungen handelt, bei denen immunologische und umweltbedingte Faktoren einerseits, sowie genetische Faktoren andererseits zur Entstehung der Krankheit beitragen (8).

2.1.3.1 Umweltbedingte Faktoren

Unter den umweltbedingten Faktoren, zu denen auch infektiöse sowie alimentäre Ursachen gerechnet werden können, ist ein bedeutsamer exogener Faktor das Rauchen. Es hat einen protektiven Wert für die CU, geht jedoch mit einem zwei- bis fünffach erhöhten Risiko an MC zu erkranken einher. Orale Kontrazeptiva erhöhen in manchen Untersuchungen

ebenfalls die Wahrscheinlichkeit einen MC zu entwickeln, auch hier steigert sich das Risiko auf bis das fünffache (9).

Besondere Beachtung fanden lange Zeit verschiedene spezifische Infektionen, v.a. mit dem Masern- und dem Paramyxovirus. Ebenso wird dem *Mycobacterium paratuberculosis*, welches in unterschiedlicher Prävalenz im Darm von MC Patienten isoliert werden kann und bei Tieren eine granulomatöse Darmerkrankung hervorrufen kann (Johne'sche Erkrankung) eine Rolle in der Ätiopathogenese zugeschrieben. Jedoch ist es bisher nicht gelungen einen kausalen Zusammenhang herzustellen (10).

Auch ist weder für die Entstehung der CU, noch des MC die Rolle der Ernährungsgewohnheiten vollständig geklärt, obwohl es sich gerade hierbei um ein intensiv diskutiertes Gebiet handelt. Ein Zusammenhang mit den diätetischen Gewohnheiten der Industrienationen (z.B. ballaststoffarme, zuckerreiche Ernährung) gilt jedoch als wahrscheinlich, kann aber nicht als alleiniger Faktor eine CED auslösen, sondern nur im Sinne der multifaktoriellen Entstehung unterstützen.

2.1.3.2 Genetische Faktoren

Aus Familienuntersuchungen und Konkordanzstudien an Zwillingen kann auf eine genetische Prädisposition für CED geschlossen werden. Verwandte ersten Grades eines Betroffenen haben ein im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung bis zu 35-fach erhöhtes Risiko ebenfalls an Morbus Crohn zu erkranken (11), die Konkordanz für monozygote Zwillinge liegt bei 20-50%, bei Dizygoten jedoch lediglich bei 0-7% (12) (13) (14).

Etwas weniger ausgeprägt ist das familiäre Auftreten der CU. Hier findet sich ein um den Faktor 15 erhöhtes Risiko selbst an CU zu erkranken (11), wenn bereits ein erstgradig Verwandter betroffen ist. Es zeigen sich Konkordanzraten von 6-16% bei monozygoten Zwillingen und 0-5% bei Dizygoten (12) (13) (14).

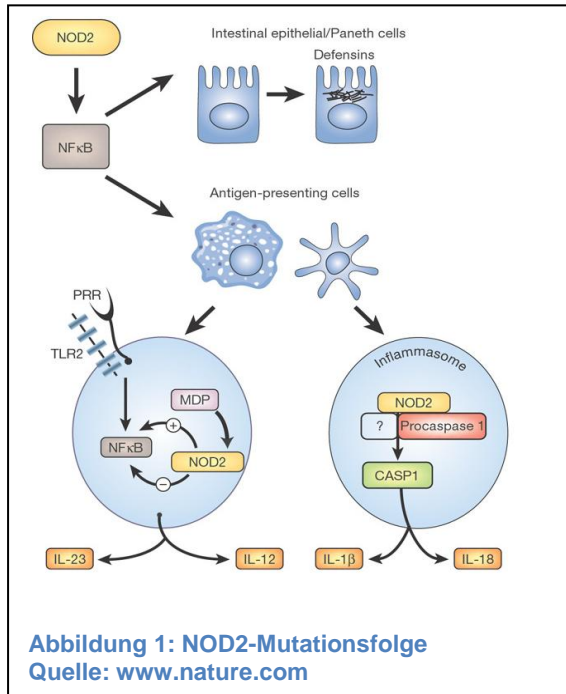
Auch das bevorzugte Auftreten bei Angehörigen einer bestimmten Bevölkerungsgruppe legt eine genetische Disposition nahe. Bei den Ashkenazi-Juden findet sich eine 2-4 fach erhöhte Inzidenz und eine 2-9 fach erhöhte Prävalenz für MC verglichen mit ihren nicht-jüdischen Nachbarn (15).

Region	Lokalisation
IBD 1	Chromosom 16
IBD 2	Chromosom 12
IBD 3	Chromosom 6
IBD 4	Chromosom 14
IBD 5	Chromosom 5
IBD 6	Chromosom 19
IBD 7	Chromosom 1
IBD 8	Chromosom 16
IBD 9	Chromosom 9

Tabelle 1: Genloki bei CED, modifiziert nach (16)

Durch weiterführende Analysen ist es gelungen Risikoregionen auf verschiedenen Chromosomen zu identifizieren (11). Eine Übersicht der bisher identifizierten CED-Genloki kann **Tabelle 1** entnommen werden. Diese Gen-Regionen kodieren für unterschiedlichste Gen-Produkte und sind in ihrem Zusammenspiel an der Regulation des intestinalen Immunsystems beteiligt (16).

Diesen genetischen Erkenntnissen zufolge spielen Mutationen am IBD1 – Genlokus im sogenannten NOD-2/CARD-15-Gen auf Chromosom 16



eine besonders wichtige ätiopathogenetische Rolle bei MC. NOD-2 ist ein intrazellulärer Rezeptor, der an der proinflammatorischen NF-κB-Signaltransduktion beteiligt ist und dessen Mutation zu einer Überproduktion von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen und somit zu einer Störung des

intestinalen Immunsystems führt, wie in **Abbildung 1** gezeigt wird (17) (18). Von besonderer Bedeutung ist hier auch die mit der NOD-2 – Mutation einhergehende gestörte Toleranz der toll-like-receptors (TLR), besonders TLR-4, dessen Überaktivierung zu einer ungehemmten Produktion von TNFα führt, was wiederum zur Aufrechterhaltung der intestinalen Entzündung beiträgt (19). Homozygote Träger haben hierbei ein 40-fach höheres Risiko an der fibrostenosierenden Verlaufsform des MC, sowie an einem Befall des terminalem Ileum oder des Dünndarms zu erkranken, wie in einer Metaanalyse gezeigt werden konnte. Jedoch können NOD-2/CARD-15 – Mutationen maximal 20% aller MC-Fälle erklären (17) (20) (21).

Bei der CU dagegen ist in weniger als 1% der Fälle eine familiäre Häufung beschrieben. In diesen Fällen konnte zusätzlich ein Gen – MUC-3 –

identifiziert werden, das auf dem Chromosom 7 lokalisiert ist, und für ein intestinales Muzin kodiert. Mutanten dieses Allels stellen Suszeptibilitätsgene für CU dar (22).

2.1.3.3 Immunologische Faktoren und Darmflora

Wissenschaftliche Untersuchungen der letzten Jahre richten ihren Blick vermehrt auf die Bedeutung immunologischer Faktoren bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der CED. Während der gesunde Darm in der Lage ist, eine Immunreaktion gegen luminale mikrobielle und nutritive Antigene sowie gegen die eigene Darmflora in physiologischen Rahmenbedingungen zu halten, ist diese Fähigkeit bei CED gestört und es resultiert eine chronische Aufrechterhaltung der Immunreaktion und damit eine Chronifizierung der so induzierten intestinalen Entzündung. Die lokale Zerstörung des Darms und die typischen klinischen Symptome sind die Folge (23) (24) (25).

Hierbei stellt die physiologische Darmflora einen bedeutenden Faktor dar, denn die Entstehung einer CED im „keimfreien“ Darm konnte im Tier-Modell bisher nicht nachgewiesen werden (26). Spezifische Erreger, gegen deren Vorkommen eine überschießende Immunantwort nachgewiesen werden kann, sind z.B. *Bacteroides vulgatus*, *Desulfovibrio desulfuricans* oder auch *Helicobacter hepaticus*, aber auch bakterielle L-Formen von *Enterococcus faecalis* und *Escherichia coli* (26).

Zu den immunologischen Komponenten des Darms gehören intestinale Makrophagen, sowie intraepitheliale (IEL) und in der Lamina

propria gelegene (LPL) Lymphozyten. Zusätzlich sind intestinale Epithelzellen (IEZ), intestinale Myofibroblasten, glatte Muskelzellen, intestinale Mast- und Endothelzellen von Bedeutung. Diese Zellen sind zur Aufrechterhaltung einer funktionierenden Immunreaktion, die aus pro-entzündlichen Faktoren wie z.B. Interleukin (IL)-1, IL-6 und TNF α (27) einerseits sowie aus anti-entzündlichen Faktoren, wie z.B. IL-4, IL-10 und TGF β (28) andererseits besteht, notwendig. Bei den CED besteht ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (29).

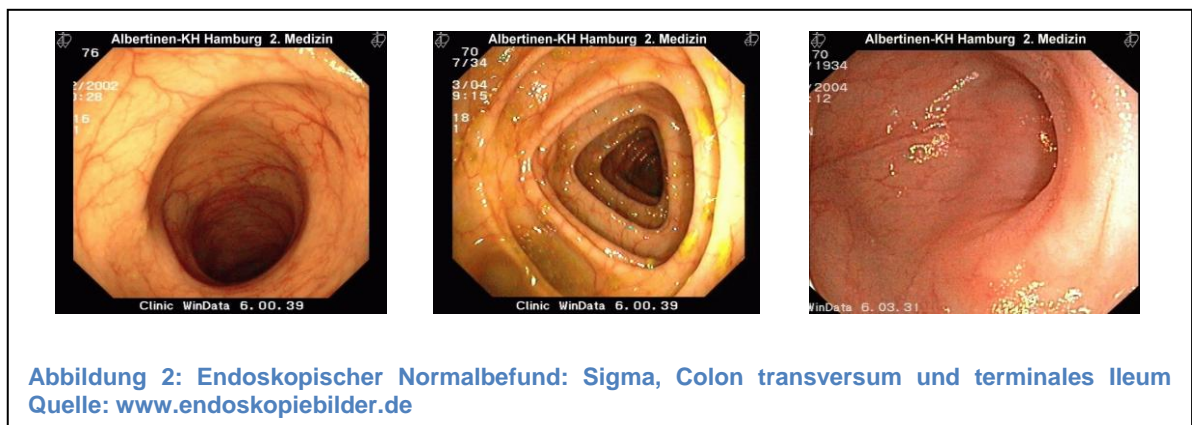
Beim MC steht vor allem die exzessive Th-1-T-Zell-Antwort auf antigene Stimuli im Vordergrund (30), die zu einem erhöhten Spiegel proinflammatorischer Zytokine und zur konsekutiven Aktivierung des Immunsystems führt. Besonders die Aufrechterhaltung der Entzündung durch z. B. TNF- α (25), aber auch die hohe Reaktivität der humoralen Abwehr bei MC-Patienten gegen alimentäre und körpereigene Antigene spielen hier eine wesentliche Rolle. Auf diese Autoantikörper soll im Folgenden noch detaillierter eingegangen werden.

Bei der CU hingegen – die gerade wegen des Vorkommens von IgG-Auto-Antikörpern gegen Enterozyten und pANCA's oftmals zu den Autoimmunerkrankungen (23) (31) gerechnet wird – steht dahingegen eine Fehlregulation auf Th-2-Zell-Ebene im Vordergrund (25) (30) (32), was einerseits zu einer pathologischen Aktivierung von Makrophagen und andererseits von Plasmazellen mit konsekutiver Produktion von Auto-Antikörpern und Aufrechterhaltung der Entzündung der Mukosa führt (25) (32) (33).

2.1.4 Diagnostik und Differenzierung

2.1.4.1 Klinik und diagnostische Methoden

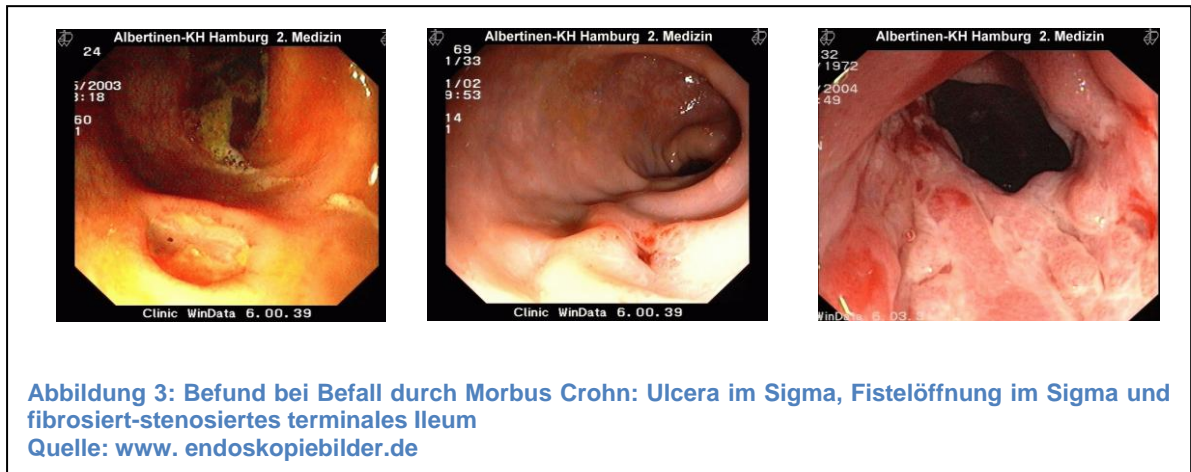
Bei der initialen Diagnostik des Morbus Crohn, spielen neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung bildgebende Verfahren, neben dem Ultraschall an erster Stelle die Endoskopie, die Hauptrolle.



Klinisch klagen die Patienten meist über Durchfälle und Schmerzen im rechten Unterbauch. Blut im Stuhl kann auftreten, ist aber im Vergleich zur Colitis ulcerosa deutlich seltener. Ebenso können systemische Auswirkungen wie Ernährungsstörungen (Vitamin B12-Mangel bei Beteiligung des terminalen Ileums sowie Gewichtsverlust durch ein Malabsorptionssyndrom) und Fieber vorkommen (34) (35).

Abweichend vom Normalbefund der Koloskopie, wie er in **Abbildung 2** zu sehen ist, finden sich beim MC in variabler Ausprägung aphthoide Läsionen, Schleimhautulzera, Fistelöffnungen – welche in der Endoskopie nicht immer zuverlässig dargestellt werden können – sowie Stenosen (36). Tiefe fissurähnliche Ulzerationen treten in fortgeschrittenen Stadien auf und

geben der Schleimhaut das sogenannte „Pflasterstein-Relief“. **Abbildung 3** zeigt mögliche Befunde bei der Endoskopie eines Patienten mit MC.



Zur weiterführenden Diagnostik – auch in der Endoskopie (Gastro- und Koloskopie) nichteinsehbarer Abschnitte des Gastrointestinaltraktes – empfehlen sich radiologische Untersuchungen wie z.B. MR-Enteroklysma oder in besonderen Situationen die Kapselendoskopie (36) (37).

Die Aktivität der Erkrankung jedoch wird mittels sogenannter Aktivitätsindices bestimmt, welche hauptsächlich die klinische Symptomatik sowie Laborparameter zur Schweregradbestimmung heranziehen. Der bekannteste und klinisch gebräuchlichste ist der **CDAI** (Crohn's disease activity index *nach Best*).

Hauptsymptom der Colitis ulcerosa sind rektale Blutungen oder blutige Durchfälle. Viele Patienten klagen über abdominelle Schmerzen mit Betonung der linken Seite, die vorwiegend bei Defäkation auftreten (Tenesmen). Die Stuhlfrequenz ist erhöht und der Stuhldrang vermehrt (38). Systemisch kann Müdigkeit, Gewichtsverlust und Fieber auftreten.

Bei der Colitis ulcerosa sind bei leichter Verlaufsform in der Endoskopie

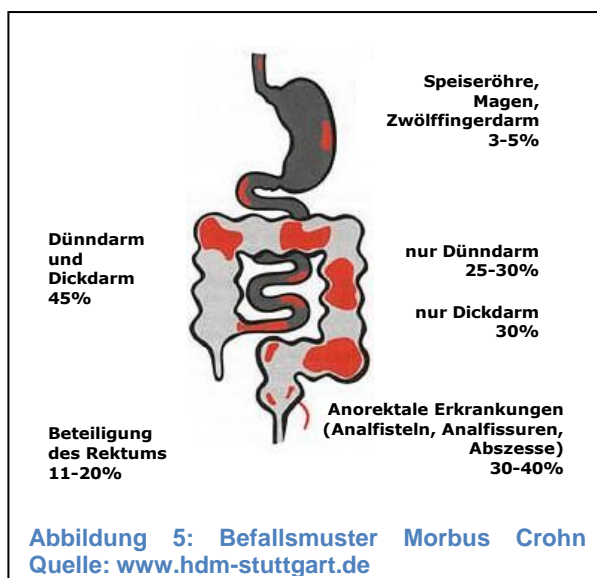
v.a. diffuse Rötungen, ein Ödem der Schleimhaut sowie Kontaktvulnerabilität auffällig. Mit zunehmendem Entzündungsgrad kommt es zu oberflächlichen Exsudaten, Spontanblutungen und flachen Ulzerationen. In noch schwereren Fällen kommt es zur Aufhebung der Haustrierung sowie zur Entstehung von



Pseudopolypen. Typische Veränderungen des koloskopischen Befundes bei Colitis ulcerosa zeigt **Abbildung 4**.

2.1.4.2 Pathologie und Verlauf

Beim **Morbus Crohn** handelt es sich um eine transmurale



Entzündung, deren Befall des Darms diskontinuierlich-segmental erfolgen kann (34) (35) und folglich mit dem Begriff der „Skip-Lesions“ beschrieben wird. Hauptlokalisationen beim MC sind meist das terminale Ileum und das Kolon, jedoch

kann eine Manifestation im gesamten Verdauungstrakt erfolgen. In etwa 25%

der Fälle ist nur der Dünndarm oder ebenso in 30% nur der Dickdarm befallen, und in weiteren 45% der Dick- und Dünndarm gemeinsam. **Abbildung 5** zeigt das typische Befallsmuster eines MC mit Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Komplikationen. Solche sind beim Morbus Crohn recht häufig: Mehr als 60% aller Patienten leiden wenigstens einmal während des Krankheitsverlaufes an Analfissuren, Fisteln, Stenosen oder Abszessen. Der Entzündungsprozess kann sich durch Bildung von Fisteln sowohl innerhalb des Verdauungstraktes – typisch sind enteroenterische, ileocoecale und ileosigmoidale Fisteln – als auch außerhalb ausbreiten. Fisteln zur Blase, Vagina oder zum Retroperitonealraum sind nicht selten beobachtete Komplikationen (7). Ebenso kann ein Ileus auftreten, dieser hat entweder die ödematöse Auftreibung der Darmwand oder eine narbige Stenose aufgrund einer Fibrose zur Ursache.

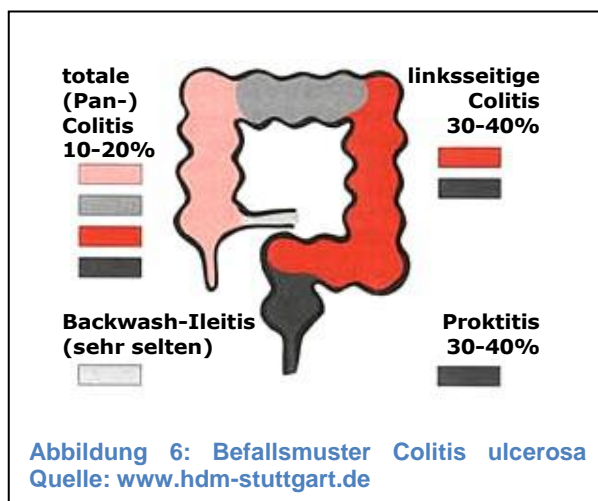
Histologisch gesehen beinhaltet das entzündliche Infiltrat unter anderem Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen, es kommt auch zur Beteiligung des Peritoneums, angrenzender Lymphknoten sowie der Serosa und des Mesenteriums (7). Bei etwa 35-50% aller Patienten lassen sich pathognomonische nicht verkäsende epitheloidzellige Granulome mit mehrkernigen Riesenzellen nachweisen (22).

Nach der Erstmanifestation der Erkrankung erleidet der größte Teil der Betroffenen einen Rückfall. Innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung muss ein knappes Drittel der Erkrankten operiert werden. Die Häufigkeit eines operativen Eingriffes bei den verbleibenden Patienten

wird mit 5% pro Jahr angegeben (39) (40). Die Rückfallrate jedoch kann durch eine Operation nicht gesenkt werden. Innerhalb eines Jahres kommt es sogar bei 80% der Patienten nach chirurgischem Eingriff zu einem erneuten Auftreten der Erkrankung, dann zumeist proximal der eigentlichen Operationsstelle (41).

Anders als beim Morbus Crohn ist der entzündliche Prozess bei der **Colitis ulcerosa** nicht transmural, sondern bleibt auf die Mukosa und Submukosa des Kolons beschränkt (34) (35).

Typischerweise breitet sich die Erkrankung kontinuierlich vom Rektum



aus beginnend nach proximal aus, jedoch sind einige wenige Fälle dokumentiert, in denen es zu einer Aussparung des Rektums kommen soll (42). Die weitere Ausdehnung des Krankheitsprozesses variiert. Bei

Erwachsenen ist in ca. 33 % der Fälle nur das Rektum betroffen, zu weiteren 33% dehnt sich der Krankheitsprozess bis zur linken Kolonflexur und zu etwa 15 % auf das gesamte Kolon aus, was auch **Abbildung 6** entnommen werden kann. In seltenen Fällen kommt es zusätzlich zum Befall des terminalen Ileums, der so genannten „Backwash-ileitis“, bei der die Entzündung auf das terminale Ileum übergreift.

Bei leichteren Schüben einer CU ist im Gegensatz zum MC eine „restitutio ad integrum“ möglich; häufige Komplikationen sind perianale

Blutungen, wohingegen Stenosen und Fisteln deutlich seltener Auftreten als beim MC. Gefürchtet ist die Entstehung eines toxischen Megakolons, einer Motilitätsstörung des Darmes mit Perforationsgefahr.

Histopathologisch treten Mikroabszesse und vornehmlich eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der Lamina propria auf. In späteren Stadien kommt es zu oberflächlichen Ulzerationen der Schleimhaut, die makroskopisch sichtbar und von mukopurulentem Exsudat bedeckt sind. Häufig sind Pseudopolypen nachweisbar (34) (35).

Nach Remission der Erkrankung kommt es typischerweise zu Rückfällen, wobei deren Häufigkeit und Ausprägung sehr variabel ist. Patienten mit Colitis ulcerosa haben weiterhin ein signifikant erhöhtes Risiko für Kolonkarzinome (43).

2.1.4.3 Extraintestinale Manifestationen

Bei beiden Erkrankungen sind extraintestinale Manifestationen (EIM), besonders Arthritiden (in Form von Oligoarthritis und einer Sakroileitis), Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Uveitis und Iritis beschrieben worden, aber auch Komplikationen wie eine primär sklerosierende Cholangitis (PSC), Pankreatitiden, Osteoporose sowie Gallen- und Nierensteine, können auftreten. EIM werden in 6-47% der Fälle beobachtet (44) (45) (46). Ähnlich wie für die CED als Grunderkrankung konnte für die EIM in Konkordanzstudien an Zwillingen eine familiäre Häufung nachgewiesen werden, was wiederum eine genetische Disposition nahelegt. So wird das Auftreten einer Sakroileitis gleichzeitig mit der NOD-2 – Mutation

gehäuft beobachtet, das Vorkommen von Gelenksbeschwerden mit dem Typ HLA-B27 und das Auftreten einer PSC mit dem Typ HLA-B8/DR4 (47). Generell treten in vielen Untersuchungen extraintestinale Komplikationen beim MC häufiger auf, als bei der CU, wobei dieser Effekt bei Beteiligung der Haut und der Augen geringer ausgeprägt ist (32) (47).

Das Vorkommen von EIM ist des Weiteren von besonderem Interesse, da bereits bei Erstmanifestation der CED bis zu 30% der Patienten über Arthralgien, etwa 15% über Hauterscheinungen und bis zu 7% über okuläre Komplikationen klagen (48). Gerade bei Patienten, die bei ersten Symptomen der CED selbst nur von EIM in Kombination mit allgemeinen Symptomen wie Durchfällen und abdominellen Schmerzen sowie Abgeschlagenheit betroffen sind gestaltet sich die richtige Diagnosestellung schwierig und es wäre wünschenswert über einfache Tests zu verfügen um auf teure und anstrengende Untersuchungsverfahren verzichten zu können.

Daher wären verlässliche Screening-Testverfahren, basierend auf Serum-Antikörpern eine deutliche Erleichterung, jedoch konnte bisher keine Assoziation von Serum-Antikörpern mit EIM beobachtet werden (49).

2.1.4.4 Probleme bei der Diagnose und Differenzierung

Colitis ulcerosa und Morbus Crohn müssen differentialdiagnostisch nicht nur gegeneinander selbst, sondern auch gegen verschiedene Colitiden anderer Ätiologie abgegrenzt werden. Während schon häufig die Differenzierung von infektiösen, strahlungsinduzierten, vaskulären oder toxischen Kolitiden nach dem ganzen diagnostischen Arsenal verlangt, ist in

9-20% der Fälle die Unterscheidung zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn anhand der klinisch-anamnestischen, serologischen, endoskopischen und histologischen Untersuchungen nicht möglich. In diesem Fall erfolgt die Diagnose einer eigenen Entität, die als **Colitis indeterminata** (CI) bezeichnet wurde, in jüngster Zeit jedoch zunehmend als „nicht klassifizierte chronisch entzündliche Darmerkrankung“ bezeichnet wird (50) (51) (52).

Schwierigkeiten bei der korrekten Zuordnung der zugrunde liegenden Erkrankung machen vor allem Patienten, die mit isoliertem Befall des Colon vorstellig werden, oder solche die lediglich mit einem Befall des Dünndarms aufwarten. Bei der ersten Gruppe ist die Klinik sowohl für CU als auch MC äußerst homogen und sie können oftmals nur histologisch unterschieden werden, bei zweiter können gelegentlich zunächst nur Allgemeinsymptome auftreten und sie werden dann zunächst gar nicht erst den CED zugeordnet (48) (53).

Gerade aber die Unterscheidung zwischen den Entitäten und die korrekte Zuordnung der CED ist von besonderer Dringlichkeit, da insbesondere der weitere Therapieweg – nämlich das Ansprechen auf Medikamente und die chirurgischen Optionen – von der Grunderkrankung bestimmt wird (48) (53).

In diesen diagnostisch anspruchsvollen Fällen wäre eine zusätzliche Unterscheidungshilfe, beispielsweise in Form der bereits erwähnten Serum-Antikörper-Bestimmungen, hilfreich. Zum einen ließen sich so – falls diese geeignet sind – Patienten ohne CED schneller und einfacher von solchen mit CED unterscheiden, zum anderen könnten Patienten mit CI ihrer

eigentlichen Grunderkrankung – Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn zugeordnet werden – und so die Therapieentscheidung schneller und individuell angepasster getroffen werden, was mit den bisher üblichen Antikörpern ASCA und pANCA alleine noch nicht ausreichend möglich ist (53) (54).

2.2 Vorkommen verschiedener Antikörper bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Wie oben dargestellt erweist sich die Unterscheidung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bisweilen als schwierig, weswegen schon früh versucht wurde, serologische Parameter für die Differentialdiagnose zu entdecken. Erste Autoantikörper wurden in der mehr als 40jährigen diesbezüglichen Forschung bereits 1959 von Broberger und Perlmann beschrieben, damals hauptsächlich gegen Erythrozytenantigene gerichtet (55), jedoch mit geringer Sensitivität und Spezifität, weswegen sie sich in der Routinediagnostik nicht durchgesetzt haben.

2.2.1 Antikörper gegen perinukleäre antineutrophile

zytoplasmatische Antikörper (pANCA)



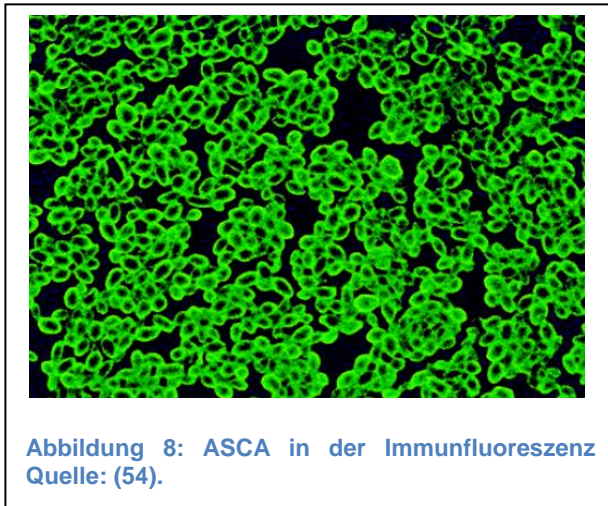
Bei den perinukleären antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (pANCA) handelt es sich um Autoantikörper, die mit hohen Prävalenzen bei Erkrankungen wie z.B. autoimmuner Hepatitis, primär sklerosierender Cholangitis aber auch bei der Colitis ulcerosa vorkommen. Verschiedene Antigene können Ziel dieser Antikörper sein. Ihren Namen verdanken diese Autoantikörper ihrer „perinukleären Fluoreszenz bei der Immunfluoreszenz auf Äthanol-fixierten Zytozentrifugenpräparaten von Neutrophilen“ (54) (56). Dementsprechend werden pANCA mittels Immunfluoreszenz bestimmt.

Sie wurden 1990 erstmals beschrieben und werden mit einer Prävalenz von etwa **60-80% bei der Colitis ulcerosa** jedoch nur mit einer Prävalenz von **5-20% beim Morbus Crohn** gefunden, ferner ergibt sich eine **Sensitivität von 65-70%** und eine **Spezifität von 80–85%** bei der Diagnose einer Colitis ulcerosa gegenüber gesunden Kontrollgruppen, aber es finden sich pANCA positive Krankheitsverläufe bei eosinophiler und kollagener Kolitis, was die Wertigkeit des Markers einschränkt (57) (58) (59).

Eine Korrelation mit Lokalisation und Schweregrad der Entzündung beim Morbus Crohn wird kontrovers diskutiert, es scheinen sich jedoch erhöhte

pANCA-Titer bei komplizierten Verläufen sowie isoliertem Befall des Colon descendens zu finden; außerdem persistieren hohe pANCA-Level nach Kolektomie (60) (61).

2.2.2 Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (ASCA)



Bei ASCA handelt es sich um einen erstmals 1988 von Main, et al. als Crohn-spezifisch beschriebenen Autoantikörper. Dieser ist gegen endständige Kohlenhydratreste, nämlich α -1,2- und α -1,3-

Mannose, wie sie in der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* sowie bei bestimmten Wuchsformen von *Candida albicans* vorkommen (59) (62). Laborchemisch können ASCA sowohl mittels ELISA, als auch immunfluoreszenz-technisch, bestimmt werden. Es empfiehlt sich jedoch die Detektion mittels ELISA.

ASCA konnte in zahlreichen nachfolgenden Studien als sensitiver und spezifischer Marker für MC bestätigt werden, er findet sich mit einer Prävalenz **von 60-70% bei Crohn-Patienten**, jedoch nur mit Prävalenzen von **10-25% bei Colitis ulcerosa** (63) (64). Weiterhin ergibt sich eine **Sensitivität von 50-70%** und eine **Spezifität von 80-85%** für die Detektion eines Morbus Crohn verglichen mit einer gesunden Population, wobei in bis

zu 10% der Fälle ASCA positive Verläufe auch bei Zöliakie und autoimmuner Hepatitis auftreten, was die Wertigkeit des Markers limitiert (59) (63) (65).

Darüber hinaus wird von einigen Autoren ein deutlich erhöhter Titer an ASCA beschrieben, wenn ein Befall des Dünndarms oder ein komplizierender Verlauf mit Fisteln sowie Stenosen (63) oder ein früher Krankheitsbeginn auftritt (66) (67); und auch ein Vorkommen von erhöhten ASCA-Titern bei nicht-erkrankten erstgradig Verwandten von Crohn-Patienten mit einer Prävalenz von bis zu 25% wird berichtet (68).

2.2.3 Wertigkeit der Kombination von Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (ASCA) und perinukleären antineutrophilen zytoplasmatische Antikörpern (pANCA) in der Differentialdiagnose der CED

Eine Vielzahl an Studien konnte zeigen, dass die Kombination der beiden Autoantikörper ASCA und pANCA die Differentialdiagnose zwischen den Entitäten der CED erleichtern kann (66) (67) (69) (70).

Setzt man **ASCA(+)/pANCA(-)** gleich der Diagnose Morbus Crohn und dagegen **ASCA(-)/pANCA(+)** gleich der Diagnose Colitis ulcerosa, so lässt sich eine Verbesserung der Spezifität erzielen, jedoch zum Preis einer erniedrigten Sensitivität, was Bossuyt in einer Metaanalyse mehrerer Studien belegt hat (71). Die **Sensitivität** für ASCA(+)/pANCA(-) für die Diagnose MC liegt hierbei zwischen 30% und 56% und für ASCA(-)/pANCA(+) für die Diagnose CU bei 44-58%; die **Spezifität** für ASCA(+)/pANCA(-) bei der

Diagnose MC liegt bei 92-97% und für ASCA(-)/pANCA(+) bei CU zwischen 81% und 91% (71) (72).

Gerade wegen dem Verlust an Sensitivität stellt dieses Untersuchungsverfahren mittels ASCA- und pANCA-Antikörper kein sehr gut geeignetes Screeningverfahren für CED dar, jedoch lässt sich die Testung der Antikörper als differentialdiagnostisches Kriterium zur Unterscheidung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa heranziehen.

2.2.4 Antikörper gegen exokrines Pankreas (PAB)

Autoantikörper gegen exokrines Pankreas wurden 1984 erstmals von Stöcker et al. als für den Morbus Crohn hochspezifische Antikörper beschrieben (73). Die Detektion der PAB erfolgt mittels Immunfluoreszenz. Bei den PAB werden zwei Typen unterschieden: PAB I, als großtropfige Variante und PAB II als feingranulärer Typ.

Sowohl die Prävalenz, als auch die Sensitivität der PAB liegen bei MC-Patienten bei 30%, ein Vorkommen bei (erstgradig) Verwandten von MC-Patienten wird entweder gar nicht (74) oder in sehr geringem Ausmaß beschrieben (75), was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei nicht um Marker mit genetischem Hintergrund handelt. Weder wird eine vermehrte Korrelation der PAB mit Geschlecht, Aktivität, extraintestinalen Manifestationen, Befallsmuster noch mit operativen Interventionen gefunden. Lediglich ein erhöhtes Vorkommen bei Patienten mit Pankreasinsuffizienz ist beschrieben.

Aufgrund der niedrigen Sensitivität von PAB für den Morbus Crohn von etwa 30% wird die Verwendung von PAB alleine zur Differentialdiagnose zwischen MC und CU als nicht sinnvoll erachtet (74) (75) (76).

2.2.5 Antikörper gegen bakterielle Oberflächenproteine: anti-cBir1, anti-OmpC und anti-I2

Weiterhin existieren eine Reihe neuerer Antikörper bei Morbus Crohn, die allesamt gegen die Oberflächenproteine bakterieller Mikroorganismen gerichtet sind. Darunter sind vor allem anti-OmpC, anti-cBir1 und anti-I2 von Bedeutung (77) (78) (79).

Anti-cBir1-Antikörper sind gegen das *Flagellin-Protein cBir1* gerichtet und vermögen im Maus-Modell durch immunologische Aktivierung eine Colitis hervorzurufen. Die Expression von anti-cBir1 ist mit einem Befall des Dünndarms ebenso wie mit fibrosenosierendem und fistulierendem Verlauf des Morbus Crohn vergesellschaftet (80). Xue et al. zeigten ebenso, dass eine Assoziation mit einem frühen Krankheitsbeginn und der Notwendigkeit von Operationen besteht (81). Ein Auftreten von cBir1 wird bei 50% der MC-Patienten und 6% der CU-Patienten beobachtet (59).

Anti-OmpC-Antikörper richten sich gegen das *Oberflächen-Porin C der äußeren Membran von Escherichia coli* und werden mit Prävalenzen von 38-55% bei Morbus Crohn gefunden, jedoch bei lediglich 2% der CU-Patienten. Das Vorkommen von anti-OmpC ist mit einem Befall des Dünndarms (82) ebenso wie mit fistulierendem Verlauf des Morbus Crohn assoziiert (79). Hohe Serum-Level an anti-OmpC finden sich auch bei

aggressiven, früh-beginnenden, und lange Zeit aktiven Verlaufsformen (49) (83) (84).

Anti-I2-Antikörper richten sich gegen *Pseudomonas fluorescens* und treten bei etwa 50% der MC-Patienten auf, wohingegen sie bei nur 10% der Patienten mit Colitis ulcerosa gefunden werden. Titer von anti-I2 finden sich bei fibrostenosierendem Verlauf erhöht, ebenso bei Notwendigkeit eines operativen Eingreifens (83) (85) und bei einem Befall des Dünndarms (82).

Jegliche Serumreaktion auf das Vorhandensein einer der drei dargestellten Marker war in Studien mit der Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention verknüpft (79).

Das Vorkommen dieser Antikörper gegen bakterielle Oberflächenantigene hat also nicht nur diagnostischen Wert, sondern ist auch mit der Verlaufsform der Erkrankung assoziiert (49) (79) (84).

2.2.6 Vorkommen neuer Antikörper: Anti-Mannobiosid

Carbohydrat IgG-Antikörper (AMCA), Anti-Laminaribiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (ALCA) und Anti-Chitobiosid Carbohydrat IgA-Antikörper (ACCA), sowie Anti-Laminarin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-L) und Anti-Chitin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-C)

Weitere Autoantikörper, welche bei der Differenzierung und Diagnostik der CED helfen können sind die *Anti-Glykan-Serumantikörper*: Anti-Chitobiosid Carbohydrat IgA-Antikörper (ACCA), Anti-Laminaribiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (ALCA), Anti-Mannobiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (AMCA), sowie Anti-Laminarin (Anti-L) und Anti-Chitin (Anti-C) Der Nachweis dieser Antikörper gelingt mittels ELISA. Bisher ist die Datenlage zu diesen Antikörpern jedoch begrenzt.

ACCA tritt bei 21-25% aller MC-Patienten, jedoch nur bei 5-15% der CU-Patienten auf. Sensitivität und Spezifität betragen 21 und 85% (59) (63).

ALCA wird mit einer Prävalenz von 18-27% bei MC-Patienten und bei 4-7% der CU-Patienten gefunden. Sensitivität und Spezifität belaufen sich auf 18 bzw. 93% (59) (63).

AMCA wird in 28% der Fälle bei Morbus Crohn detektiert, jedoch auch bei 18% der Colitis ulcerosa. Damit beträgt die Sensitivität 28% und die Spezifität 82% (59).

Bei **Anti-L** (Anti-Laminarin (Glc(β 1,3))₃n(Glc(β 1,6)n) IgA-Carbohydrat Antikörper und **Anti-C** (Anti-Chitin (GlcNac(β 1,4)n) IgA-Carbohydrat

Antikörper handelt es sich um bisher unveröffentlichte und erstmals getestete Anti-Glykan-Serumantikörper.

Aufgrund der niedrigen Sensitivität aller Marker ist bisher keine Vereinfachung bei der Differenzierung der Entitäten der CED durch ACCA, ALCA und AMCA eingetreten, bestes Instrument bleibt die Verwendung der Kombination von pANCA und ASCA. Jedoch ergibt sich einer verbesserte Abgrenzung zu anderen gastrointestinalen Erkrankungen bei Kombination von pANCA, ASCA und ALCA (59) (86).

Hohe Titer dieser Antikörper werden vor allem bei Patienten mit komplizierten und langdauernden (v.a. AMCA) aktiven Verläufen beobachtet, ebenso bei der Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention und der Beteiligung des Ileum (ACCA, ALCA, AMCA) (86).

2.3 Aufgaben- und Fragestellung dieser Arbeit

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bieten häufig ein heterogenes Krankheitsbild. Die Differenzierung der beiden Entitäten MC und CU gelingt in Zusammenschau der klinischen, radiologischen, endoskopischen und histopathologischen Kriterien, ist jedoch in etwa 9-20% der Fälle nicht eindeutig möglich (50) (51) (52) (87).

Serologische Marker sind möglicherweise hilfreich bei der Diagnose von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, sowie bei der Abgrenzung eines Morbus Crohn gegen eine Colitis ulcerosa, ebenso wie bei der Abgrenzung von CED zu anderen entzündlichen Darmerkrankungen.

Die aktuell am häufigsten verwendeten Serumantikörper sind die Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (ASCA) und die perinukleären antineutrophilen zytoplasmatische Antikörpern (pANCA). Für die tägliche klinische Praxis sind diese Marker jedoch nach wie vor nicht von ausreichender Genauigkeit (57) (59) (63) (71).

Diese Studie soll die Signifikanz der neuen Anti-Glykan-Serumantikörper Anti-Mannobiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (AMCA), Anti-Laminaribiosid Carbohydrat IgG-Antikörper (ALCA), Anti-Chitobiosid Carbohydrat IgA-Antikörper (ACCA), Anti-Laminarin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-L) und Anti-Chitin Carbohydrat IgA-Antikörper (Anti-C) in Verbindung mit den bereits etablierten Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (gASCA) und den perinukleären antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (pANCA) in der Diagnose und Differenzierung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen untersuchen.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten

3.1.1 Probandenkollektiv

Zur Durchführung der Studie wurden insgesamt **1439 Serumproben** von **824 Probanden** analysiert. Davon stammen 895 Proben von **363 Patienten mit Morbus Crohn** und weitere 213 Proben von **130 Patienten mit Colitis ulcerosa**. Weitere **257 Proben** entstammen **gesunden Probanden** und werden dem Kontrollkollektiv (**KO**) zugeteilt, ebenso wie die Serumproben von **74 Patienten mit anderer gastrointestinaler Erkrankung (GI)** als CED, zu denen entzündliche Erkrankungen wie Divertikulose/-itis, infektiöse Kolitis, pseudomembranöse Kolitis, chemotherapieinduzierte Kolitis, intestinale Vaskulitis, sowie Leberzirrhose mit gestörter intestinaler Permeabilität zählen.

Das Kollektiv der Morbus Crohn-Patienten war zu 53,2 % weiblichen Geschlechts und hatte ein Durchschnittsalter von 35,7 Jahren bei Durchführung der Studie mit einem BMI von 23,5 kg/m² bei Entnahme der Proben. Die mittlere Krankheitsdauer des untersuchten MC-Kollektives betrug 66,8 Monate bei einem Durchschnittsalter von 28,3 Jahren bei Diagnosestellung. Ein signifikanter Unterschied der Charakteristika zwischen den unterschiedlichen Gruppen des untersuchten Kollektives ergibt sich lediglich für das Durchschnittsalter bei Studienteilnahme ($p < 0,0001$).

Weitere Charakteristika des untersuchten Probandenkollektives können der untenstehenden **Tabelle 2** entnommen werden.

	Morbus Crohn (N=363)	Colitis ulcerosa (N=130)	GI (N=74)	KO (N=257)
Weiblich, n (%)	193 (53.2)	51 (39.2)	27 (36.5)	154 (60.4)
Durchschnittsalter bei Studie [Jahre] (SD)	35.7 (12.2)	39.3 (12.7)	60.7 (13.8)*	43.9 (15.2)
Durchschnittlicher BMI [kg/m ²] (SD)	23.5 (5.2)	24.5 (5.1)	26.9 (5.6)	26.4 (6.6)
Durchschnittsalter bei Diagnose [Jahre] (SD)	28.3 (12)	32.3 (12.8)		
Mittlere Krankheitsdauer [Monate] (P25, P75)	66.8 (11, 141)	60.5 (22.4, 137.1)		
Lokalisation				
Oberer GI-Trakt, n (%)	40 (11.1)			
Jejunum, prox. Ileum, n (%)	40 (11.2)			
Ileocöcal, n (%)	109 (30.0)			
Colon ohne Cöcum, n (%)	54 (14.9)			
Ileum und Colon, n (%)	199 (55.0)			
Rectum, n (%)	131 (36.3)			
Verhalten				
Entzündlich, n (%)	87 (24.0)			
Stenosen, n (%)	90 (24.8)			
Fisteln, n (%)	186 (51.4)			
Notwendigkeit einer Intervention, n (%)	257 (70.8)			

SD: Standardabweichung und P25, P75: 25. und 75. Perzentile
 *p<0,0001 zu MC, CU und KO

Tabelle 2: Charakteristika des Patientenkollektives

Das schriftliche Einverständnis jedes Teilnehmers wurde eingeholt. Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Universität Regensburg im Rahmen des „Kompetenznetz chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ genehmigt.

3.1.2 Aufstellung der zu analysierenden Kohorte

Im Rahmen der Studie wurden 895 Serumproben von 363 Patienten mit Morbus Crohn analysiert, wobei von 209 Patienten Proben **zu unterschiedlichen Zeitpunkten** gewonnen werden konnten. Weiterhin wurden 213 Serumproben von 130 Colitis ulcerosa Patienten untersucht. In diesem Probandenkollektiv wurden bei 45 Teilnehmern Proben zu mehreren Zeitpunkten konserviert.

Gesamtproben (N)		Anzahl der Besuche und Häufigkeit der Patienten mit										
		Mehrfachbesuchen										
		1x	2x	3x	4x	5x	6x	7x	8x	9x	10x	11x
MC (N=363)	895	154	75	57	26	22	12	10	2	3	1	1
CU (N=130)	213	85	28	6	5	4		2				
MC: Morbus Crohn, CU: Colitis ulcerosa												

Tabelle 3: Mehrfachbesuche der Patienten mit MC und CU

Aus der hier abgebildeten **Tabelle 3** kann neben der Anzahl der Besuche auch die Häufigkeit der mehrfachen Besuche der Patienten entnommen werden.

Im Rahmen dieser Studie wurden vom Jahr 2000 bis zum Jahr 2006 alle CED-Patienten der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg, sowohl in der stationären als auch in der ambulanten Versorgung, zu einer möglichen Teilnahme befragt. Ausschlusskriterien lagen nicht vor. Die Diagnose einer CED fußte auf klinischen, radiologischen, endoskopischen und histopathologischen Kriterien wie von Stange et al. gefordert (87).

3.1.3 Kompetenznetz CED – Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa

Die von uns analysierten Seren sind Bestandteil der Serumdatenbank des „**Kompetenznetz CED**“. Das „Kompetenznetz CED“ ist ein Zusammenschluss von niedergelassenen Fachärzten, Fachkliniken und universitären Spezialambulanzen, um die Forschung im Bereich der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu optimieren. Neben **Berlin**, **Tübingen** und **Kiel** stellt das Universitätsklinikum **Regensburg** eine der vier universitären Spezialambulanzen. An diesen Zentren finden zudem molekulargenetische, pharmakogenetische und immunologische Studien statt. Durch den Zusammenschluss der Forschungseinrichtungen zum Kompetenznetzwerk CED wurde 1999 auch der Grundstein für zentrumsübergreifende Studien gelegt. So werden beispielsweise große Gewebe- und Serumbanken etabliert, um darauf aufbauend breite Grundlagenforschung zu ermöglichen.

3.1.4 Aufstellung der Kontroll-Kohorte

3.1.4.1 Probensammlung der Kontrollkohorte

Im Rahmen dieser Studie wurden vom September bis zum November 2006 Patienten der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg, sowohl in der stationären als auch in der ambulanten Versorgung zu einer möglichen Teilnahme befragt. Einziges Ausschlusskriterium war das Vorliegen einer CED.

So konnte Probenmaterial von 257 Kontrollpatienten ohne gastrointestinale Erkrankung (KO) und ebenso Probenmaterial von 74 Patienten mit anderer gastrointestinaler Erkrankung als einer CED (GI) gewonnen werden. Zum GI-Kollektiv wurden Patienten mit Divertikulose/-itis, infektiöser Kolitis, pseudomembranöser Kolitis, chemotherapieinduzierter Kolitis, intestinaler Vaskulitis, sowie Leberzirrhose mit gestörter intestinaler Permeabilität zugewiesen.

Das schriftliche Einverständnis jedes Teilnehmers wurde eingeholt. Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Universität Regensburg genehmigt.

3.1.4.2 Probenverarbeitung der Kontrollkohorte

Die Probengewinnung mittels Blutentnahme fand im Rahmen der Routineblutentnahmen der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg statt. Für jeden Probanden wurden zu Studienzwecken **zwei Serumröhrchen** und **zwei EDTA-Röhrchen** durch Venenpunktion abgenommen.

Anschließend wurden die Serumröhrchen im Labor nach Koagulation für **10min bei 3000rpm zentrifugiert** und anschließend jeweils **500µl** in Cryoröhrchen aliquotiert. Die Cryoröhrchen lagern bei **-80°C** und wurden **tiefgefroren, ebenso bei -80°C, zur Analyse verschickt**. Das zweite Serumröhrchen sowie die EDTA-Röhrchen lagern in der Serumbank des „Kompetenznetz CED“ des Universitätsklinikums Regensburg.

3.2 Erhebung der klinischen Daten

3.2.1 Daten der zu analysierenden Kohorte

Die klinischen Informationen der MC- und CU-Patienten wurden für jeden Besuch und jede Probenentnahme unabhängig voneinander vom gerade behandelnden Arzt der CED-Ambulanz aufgenommen. Die so erhobenen klinischen Angaben beinhalten Informationen über Alter, Zeitpunkt der ersten Symptome sowie Zeitpunkt der Erstdiagnose der CED. Weiterhin BMI (kg/m^2), Geschlecht, Datum, Zeitpunkt der Probenentnahme, Art und Häufigkeit von Komplikationen und Operationen, Krankheitsausbreitung und Krankheitslokalisation genauso wie die momentane Krankheitsaktivität und die Art der applizierten Medikamente. Die momentane Aktivität der CED wurde vom gerade behandelnden Arzt unter Berücksichtigung sämtlicher Kriterien inklusive denen im CDAI niedergelegten festgesetzt.

Nach Zusammenstellung aller für die Studie notwendigen Daten wurde diese sicherheitskodiert und anonymisiert zu Analysezwecken in eine Datenbank übertragen.

Im April 2007 wurden alle Patientenakten erneut gesichtet und die klinischen Daten unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte in die Datenbank übertragen und so Lücken in den Angaben geschlossen. Bei Patienten mit mehreren Besuchen und Probenentnahmen wurden die beim Erstbesuch genommenen Proben für die hier vorliegende Querschnittstudie

verwendet, weitere Proben wurden für die Analyse der Mehrfachbesuche verwendet.

3.2.2 Daten der Kontroll-Kohorte

Die klinischen Informationen der KO- und GI-Patienten wurden im Rahmen der Einholung des Einverständnisses zur Studienteilnahme ermittelt. Hierzu wurden für alle Kontrollpatienten gleiche Fragebögen mit den klinischen Angaben über Alter, aktuelle Symptome, BMI, Geschlecht, Datum, Zeitpunkt der Probenentnahme sowie Grunderkrankung ausgefüllt.

Nach Zusammenstellung aller für die Studie notwendigen Daten wurde diese ebenso sicherheitskodiert und anonymisiert zu Analysezwecken in unsere Datenbank übertragen.

3.2.3 Datenaufnahme und -verarbeitung

Die klinischen Daten wurden mittels des im Folgenden abgedruckten **Fragebogens** aufgenommen und anschließend zur weiteren Datenverarbeitung und -auswertung sicherheitscodiert in eine Excel-Tabelle übernommen (Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Seite 1



Klinikum der Universität Regensburg
93042 Regensburg

UNIVERSITÄT
REGENSBURG

KLINIKUM

**Serumantikörper-Studie**

Dr. med. Florian Rieder

PD Dr. med. Frank Klebl

Patientenetikett

Falls nicht vorhanden bitte ausfüllen →

Pat. ID:**Nachname:****Vorname:****Adresse:****Telefonnummer:****Datum der Erfassung dieses Bogens:****Erfasst durch:****Geschlecht:** ☐ männlich ☐ weiblich**Geburtsdatum:****Gewicht (kg):****Größe (cm):****Datum der Erstsymptomatik (Monat/Jahr):****Datum der Erstdiagnose (Monat/Jahr):****Alter bei Diagnosestellung (Jahre/Monate):****Zeit von Diagnosestellung bis zur Erfassung des Bogens
(Jahre/Monate):****Besuchsdatum bei Blutentnahme (Tag/Monat/Jahr):****Erkrank.:** ☐ Morbus Crohn ☐ Colitis ulcerosa☐ Indeterminate Kolitis☐ Sonstige Diagnosen (bitte alle angeben):

Seite 2

Status bei Blutentnahme:☐ akuter Schub☐ chron-aktiv☐ Remission☐ unbekannt**Extraintestinale Manifestationen und Komplikationen:**

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme = A; im weiteren Verlauf = V; unbekannt = U.

Falls vorhanden bitte Zeitpunkt des Auftretens nach Diagnosestellung (in Monaten) notieren

☐ Arthralgien (nur Schmerzen)☐ Arthritis☐ Sakroileitis, Spondylitis, M. Bechterew☐ Pyoderma gangränosum☐ Erythema nodosum☐ Augen (Uveitis, Iritis, Iridocyclitis)☐ Osteoporose☐ Pouchitis☐ Darmkrebs☐ Primäre sklerosierende Cholangitis☐ Autoimmunerkrankungen☐ Pankreatitis☐ Allergie☐ Sonstige:

Detaillierte Angaben Nebendiagnosen:

Lokalisation/Befallsmuster (j=ja, n=nein, u=unbekannt):

Falls Lokalisation wechselt jede jemals befallene Region notieren.

Morbus Crohn:

☐ Oberer GI-Trakt☐ Jejunum, prox. Ileum☐ Termilleum☐ Kolon (nicht Zökum)☐ Ileum und Kolon☐ Rektum

Seite 3

Colitis Ulcerosa:☐ Proktitis ☐ nur links ☐ subtotal☐ Pankolitis**Verlauf:**

Falls vorhanden bitte Zeitpunkt des Auftretens nach Diagnosestellung (in Monaten) notieren

Falls Fistel bitte Lokalisation notieren (perianal, sonstige). Falls Stenose bitte Lokalisation notieren.

☐ fistulierend ☐ stenosierend ☐ nur entzündlich**Chirurgische Therapie:**

Falls vorhanden bitte Zeitpunkt des Auftretens nach Diagnosestellung (in Monaten) notieren, bei mehrfachen Ops bitte einzeln angeben.

☐ Ileozökalresektion ☐ Dünndarmteilresektion☐ Dickdarmteilresektion ☐ Pankolektomie☐ Ileoanaler Pouch ☐ Stoma☐ Strikturoplastik ☐ Fistel/Abszessoperation☐ keine**Steroidresponse:**☐ Steroidabhängig ☐ Vorhanden☐ Steroidrefraktär ☐ unbekannt

Seite 4

Medikamententherapie:

Bitte Medikation zum Zeitpunkt der Blutentnahme notieren.

- | | | | |
|---|--|---------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> 5-ASA oral | <input type="checkbox"/> 5-ASA rektal | <input type="checkbox"/> Sulfasalazin | <input type="checkbox"/> Steroide sys. |
| <input type="checkbox"/> Steroide sys. $\geq 10\text{mg}$ | <input type="checkbox"/> Steroide lokal/rektal | | |
| <input type="checkbox"/> Budesonid oral | <input type="checkbox"/> Azathioprin | <input type="checkbox"/> Infliximab | <input type="checkbox"/> Antibiotika |
| <input type="checkbox"/> Probiotika | <input type="checkbox"/> Loperamid | <input type="checkbox"/> Sonstige: | |

Immunsuppressiva:

Mussten im späteren Verlauf Immunsuppressiva gegeben werden (Azathioprin/MTX/Infliximab)?

- ☐ ja ☐ nein

- ☐ Wenn ja, welche und welcher Zeitpunkt nach Diagnosestellung?

Labor:

Bitte Labor zum Zeitpunkt der Blutentnahme notieren (soweit vorhanden).

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> BSG 1h (mm) | <input type="checkbox"/> Hb (g/dl) |
| <input type="checkbox"/> HK (%) | <input type="checkbox"/> Albumin |
| <input type="checkbox"/> CRP (mg/dl) | |

Seite 5

Familienanamnese:☐ positiv☐ negativ

negativ

falls positiv: Wer? Diagnose? Diagnosealter?

Raucheranamnese:☐ positiv☐

Pack years?

Bierkonsum:☐ positiv☐ negativ

Verwendeter Fragebogen zur Erfassung der klinischen Daten

3.3 Technik der Bestimmungen

3.3.1 Probenversand

Nach Blutentnahme der Probanden wurden die Serumröhrchen im Labor nach Koagulation für **10min bei 3000rpm zentrifugiert** und anschließend jeweils **500µl** in Cryoröhrchen aliquotiert. Die Cryoröhrchen lagerten bei **-80°C** und wurden anschließend **tiefgefroren zur Analyse** zu Glycominds Ltd., Lod, Israel verschickt und geblindet auf die Expression von gASCA, ALCA, ACCA, AMCA Anti-L und Anti-C mittels ELISA, und von pANCA mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Alles Laboruntersuchungen wurden sowohl für ELISA (Glycominds Ltd., Lod, Israel) als auch für die Immunfluoreszenz (Glycominds Ltd., Lod, Israel) streng nach Angaben der Hersteller, und wie bereits zuvor von Dotan et al. und Ferrante et al. beschrieben durchgeführt (63) (86).

3.3.2 Bestimmung der Anti-Glykan-Serumantikörper

Zur Bestimmung der Anti-Glykan-Serumantikörper wurden jeweils **50µl** der vorverdünnten (**Verdünnung 1:101**) Serumproben zusammen mit einer Kalibratorlösung, einer positiven und einer negativen Kontrollprobe für **30 Minuten** mit den spezifischen immobilisierten Antigenen in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Glycominds Ltd., Lod, Israel) bei Zimmertemperatur von **25°C** inkubiert und nach Reaktion die **optische Dichte** (OD) bei **450nm** abgelesen.

Die Vorverdünnung der Proben erfolgte mittels einer **TBST-Lösung** (0,15mol/L Tris-HCl, 0,085mol/L Mg₂SO₄, pH 7,4 und 0,05% Tween-20) mit 1% bovinem Serum-Albumin (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) unter zusätzlicher Verwendung von DD8 (einem Oligomer aus 1,8-Diamino-3,6-Dioxatocan) als Binder zur kovalenten Verknüpfung der Anti-Glykan-Serumantikörper. Untersuchte **Antikörper** können **Tabelle 4** entnommen werden.

	Name	IUPAC-Nomenklatur
gASCA	Anti-Saccharomyces cerevisiae IgG Antikörper	
AMCA	Anti-Mannobiosid Carbohydrat IgG Antikörper	Anti-Mannobiosid (Man(α 1,3)Man(α)) Carbohydrat IgG Antikörper
ALCA	Anti-Laminaribiosid Carbohydrat IgG Antikörper	Anti-Laminaribiosid (Glc(β 1,3)Glc(β)) Carbohydrat IgG Antikörper
ACCA	Anti-Chitobiosid Carbohydrat IgA Antikörper	Anti-Chitobiosid (GlcNac(β 1,4)GlcNac(β)) Carbohydrat IgA Antikörper
Anti-L	Anti-Laminarin Carbohydrat IgA Antikörper	Anti-Laminarin (Glc(β 1,3)3n(Glc(β 1,6)n) Carbohydrat IgA Antikörper
Anti-C	Anti-Chitin Carbohydrat IgA Antikörper	Anti-Chitin (GlcNac(β 1,4)n) Carbohydrat IgA Antikörper

Tabelle 4: Übersicht der untersuchten Anti-Glykan-Serumantikörper

Nach Aufbringen von **50 μ l** des Untersuchungsserums je Kavität und Inkubation bei **25°C** Raumtemperatur für **30 Minuten** wurden ungebundene Serumkomponenten durch Waschung entfernt. Als Waschlösung diente ein **PBST-Puffer** (0,137mol/L NaCl, 0,0027mol/L KCl, und 0,012mol/L Gesamtposphat, pH 7,4 und 0,05% Tween-20; PBST, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Anschließend wurde zum Nachweis gebundener Antikörper **50µl** eines **HRP-Konjugates** (horseradish peroxidase anti-humane IgG oder IgA Antikörper von der Ziege oder vom Hasen; Glycominds Ltd., Lod, Israel) zugegeben und erneut für **30min** in Dunkelheit bei **25°C** Zimmertemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Waschung mit **PBST-Puffer** wurden **50µl** chromogenischen **TMB** (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zur Detektion der Marker beigelegt.

Die Enzymreaktion wurde mit einer **Stop-Lösung** (1 mMol/L H₂SO₄, Glycominds Ltd., Lod, Israel) beendet und die **optische Dichte** (OD) bei **450nm** photometrisch bestimmt. Die OD zeigt sich **direkt proportional** zur Menge der gebundenen Anti-Glykan-Serumantikörper.

3.3.3 Bestimmung von pANCA

Die Auswertung der Proben auf die Expression von pANCA erfolgte mittels **indirekter Immunfluoreszenz** (IFA) unter Verwendung von Objektträgern mit ethanol-fixierten Neutrophilen (Glycominds Ltd., Lod, Israel) unter zusätzlicher Durchführung einer positiven und negativen Kontrollprobe.

Zunächst erfolgte eine **Verdünnung von 1:40** der Testseren nach Herstellerangaben mit **PBST-Puffer**, wie zuvor bereits für die Anti-Glykan-Serumantikörper beschrieben und die Auftragung von je **25µl** Probenlösung auf den Objektträger mit anschließender **30minütiger** Inkubation bei **25°C** Raumtemperatur.

Anschließend wurde eine Waschung mit **PBST-Puffer** und die Inkubation mit **25 µl** Fluorescein-Isothiocyanat-markiertem Konjugat von anti-humanem IgG Antikörper vom Hasen (Glycominds Ltd., Lod, Israel) für weitere **30 Minuten** bei **25°C** Raumtemperatur und in Dunkelheit durchgeführt.

Nach erneuter Waschung mittel **PBST-Puffer** wurde die Probenanalyse unter UV-Licht mittels eines Fluoreszenzmikroskops der Marke Leitz Wetzlar Orthoplan unter einer Anregungswellenlänge von **490nm** und einer Emissionswellenlänge von **520nm** durchgeführt.

Ein möglicher störender Einfluss durch das Vorhandensein von antinukleären Antikörpern (ANAs), die das pANCA-Expressionsmuster imitieren könnten, wurde durch die weiterführende Nutzung von Objektträgern mit formalin-fixierten Neutrophilen (INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA) ausgelassen, wie vom Hersteller empfohlen.

3.3.4 Genauigkeitsanalyse und cut-off Werte

Receiver Operating Characteristic- (ROC-) Kurven wurden durch Auftragen der Sensitivität gegen (1-Spezifität) für jeden einzelnen Marker errechnet. Basierend auf den ROC-Kurven wurden die cut-off Werte bei einem EU-Wert von 90%iger Spezifität für Anti-C (50 EU) und Anti-L (120 EU) jeweils separat für die Unterscheidung von MC-Patienten gegenüber allen Patienten ohne MC (Kein MC) festgelegt. Die cut-off Werte für gASCA (50 EU), ALCA (60 EU), ACCA (90 EU) und AMCA (100 EU) wurden wie

vom Hersteller vorgeschlagen und bereits zuvor veröffentlicht angewendet (63) (86).

Der cut-off Wert für die Positivität von pANCA wurde bei einer Verdünnung von **1:40** nach Angaben des Herstellers und wie bereits zuvor veröffentlicht festgelegt (63) (86).

3.4 Auswertung und Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde die **SAS Software Version 9.1** (The SAS Institute, Cary, NC, USA) und die **Software R Version 2.4.1** (The R Institute for Statistical Computing, Wien, Österreich) verwendet. Ein errechneter Wert von **$p < 0,05$** wurde als statistisch **signifikant** angenommen.

Deskriptive Statistiken für alle Variablen – einschließlich Mittelwerte, Standardabweichungen, Perzentilenwerte für stetige Variablen und Häufigkeiten für nominale Variablen – wurden berechnet.

Mittels **univariater Varianzanalyse (ANOVA)** wurde das Alter und der BMI zwischen den untersuchten Kollektiven verglichen (MC, CU, GI, KO) und mittels **Pearson's Chi-Quadrat-Test** wurde das Geschlecht verglichen. Die Krankheitsdauer der Patienten mit MC und CU wurden mit einem **Wilcoxon Rangsummentest** analysiert. **Spearman's Korrelationskoeffizienten** wurden benutzt um die Vergesellschaftung von Anti-L und Anti-C mit gASCA, AMCA, ALCA und ACCA zu analysieren.

Mittels Anwendung des **t-test** haben wir im Rahmen der Studie die unterschiedliche Expression der Anti-Glykan-Serumantikörper in den vier untersuchten Patientenkollektiven (MC, CU, GI, KO) verglichen und

signifikante Unterschiede errechnet. Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW wurden berechnet um die diagnostische Wertigkeit für die Diagnose und Differentialdiagnose eines Morbus Crohn abzuschätzen. Zur weiteren Ermittlung der diagnostischen Wertigkeit des Antikörper-Panels werden MC-Patienten auch Patienten ohne MC gegenüber gestellt (Kein MC), dieses **Kontrollkollektiv der Kein MC-Patienten** setzt sich aus den 130 CU-Patienten, den 74 GI-Probanden und den 257 KO-Probanden zusammen.

Zusätzlich wurden, wie bereits erwähnt, Receiver Operating Characteristic- (**ROC-**) **Kurven** errechnet und die Area under the Curve- (**AUC-**) **Werte** mit den korrespondierenden 95% Konfidenzintervallen bestimmt. Dies wurde sowohl für jeden einzelnen Marker, alle Marker gemeinsam und auch für die Kombination aus gASCA, pANCA, Anti-L und Anti-C durchgeführt. Die AUC-Werte wurden mittels **DeLong's Methode** analysiert (88).

Aufgrund des Signifikanzniveaus wurde für multiples Testen nicht zusätzlich korrigiert.

4 Ergebnisse

Zur Durchführung der Studie wurden, wie bereits ausgeführt, insgesamt **1439 Serumproben** von **824 Probanden** analysiert. Davon stammten 895 Proben von **363 Patienten mit Morbus Crohn** und weitere 213 Proben von **130 Patienten mit Colitis ulcerosa**. Weitere **257 Proben** entstammen **gesunden Probanden** und werden dem Kontrollkollektiv (**KO**) zugeteilt, ebenso wie die Serumproben von **74 Patienten mit anderer gastrointestinaler Erkrankung (GI)** als CED. Die Proben der Kollektive aus CU, GI und KO wurden gemeinsam zu Analysezwecken als **Kein MC** zusammengefasst.

Die Seren dieser 824 Patienten des „Kompetenznetz CED“ wurden geblindet auf das Vorhandensein von Anti-Chitobiosid IgA Carbohydrat Antikörper (**ACCA**), Anti-Laminaribiosid IgG Carbohydrat Antikörper (**ALCA**), Anti-Mannobiosid IgG Carbohydrat Antikörper (**AMCA**), Anti-Saccharomyces cerevisiae IgG Antikörper (**gASCA**), sowie Anti-Laminarin IgA Carbohydrat Antikörper (**Anti-L**) und Anti-Chitin IgA Carbohydrat Antikörper (**Anti-C**) mittels ELISA (Glycominds Ltd., Lod, Israel) sowie auf **pANCA** mittels IFA (Glycominds Ltd., Lod, Israel) untersucht.

Die Ergebnisse wurden mittels **SAS Software Version 9.1** (The SAS Institute, Cary, NC, USA), die **Software R Version 2.4.1** (The R Institute for Statistical Computing, Wien, Österreich) und **Microsoft Excel 2003** (Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) analysiert.

4.1 Prävalenz der Serumantikörper

Wir fanden bei 77% der MC-Patienten positive Antikörpertiter für wenigstens einen Marker. **Tabelle 5** zeigt die **prozentuale Verteilung sowie kumulative Zahl der Marker** in den unterschiedlichen Patientenkollektiven.

Marker	Morbus Crohn (MC)		Kein Morbus Crohn (Kein MC)		
	Alle MC Patienten (N=363)	gASCA neg. MC Patienten (N=134)	CU (N=130)	GI (N=74)	KO (N=257)
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
gASCA	63,1	---	8,5	23,0	15,6
ACCA	16,8	13,4	6,9	20,3	11,3
ALCA	25,6	11,2	7,7	6,8	11,7
AMCA	27,3	6,0	6,9	8,1	8,9
Anti-L	25,6	12,7	7,3	10,8	9,6
Anti-C	25,0	21,6	10,5	23,0	12,4
pANCA	10,3	12,9	39,7	4,2	2,8
Anzahl positiver Marker					
0	22,6	61,2	42,1	50,0	63,0
1	24,2	22,4	69,2	27,0	22,6
2	25,9	8,2	21,5	9,5	5,1
3	10,5	6,7	5,4	8,1	4,3
4	10,7	1,5	2,3	5,4	2,3
5	3,9	0,0	0,8	0,0	2,3
6	2,2	0,0	0,8	0,0	0,4

Tabelle 5: Verteilung und Anzahl der verschiedenen Antikörper im Probandenkollektiv, sowohl für alle MC Patienten, als auch gASCA-negative MC Patienten und Kontrollgruppen

gASCA wurde bei **63,1%** der **MC-Patienten** aber auch bei 8,5% der CU-Patienten und 23% der GI-Probanden nachgewiesen. **pANCA** konnte bei **39,7%** der **CU-Patienten**, aber ebenso bei 10,3% der MC-Patienten und bei 4,2% der GI-Patienten gemessen werden.

In der Subgruppe der **gASCA-negativen Morbus Crohn-Patienten** konnte **Anti-C** mit einer Prävalenz von 21,6% als häufigster Marker der Anti-Glykan-Serumantikörper gefunden werden.

Bei **22,6% der MC-Patienten** konnte **kein Marker** detektiert werden, in der gASCA-negativen MC-Subpopulation war dies sogar zu 61,2% der Fall. Innerhalb der 257 gesunden Kontrollprobanden wurde bei 63,0% keiner der sechs Antikörper nachgewiesen, während diese Gruppe zu 0,4% alle Marker exprimierte.

Nicht nur das Vorkommen der Marker, sondern auch die **Höhe der Antikörpertiter** waren bei MC signifikant erhöht gegenüber Kein MC ($p < 0,001$, **Tabelle 6**). Alle Marker (gASCA, ACCA, ALCA, AMCA, Anti-L und Anti-C) wurden im Vergleich MC vs. Kein MC (CU, GI, KO) statistisch signifikant erhöht detektiert.

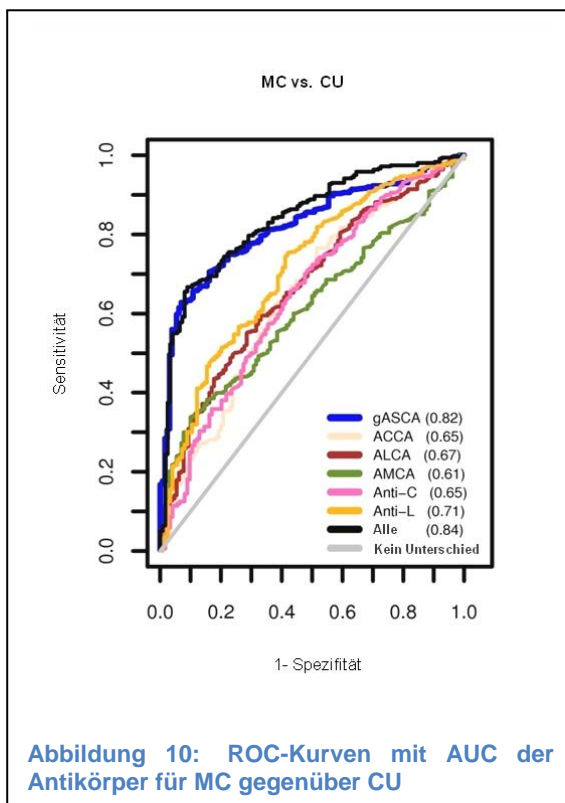
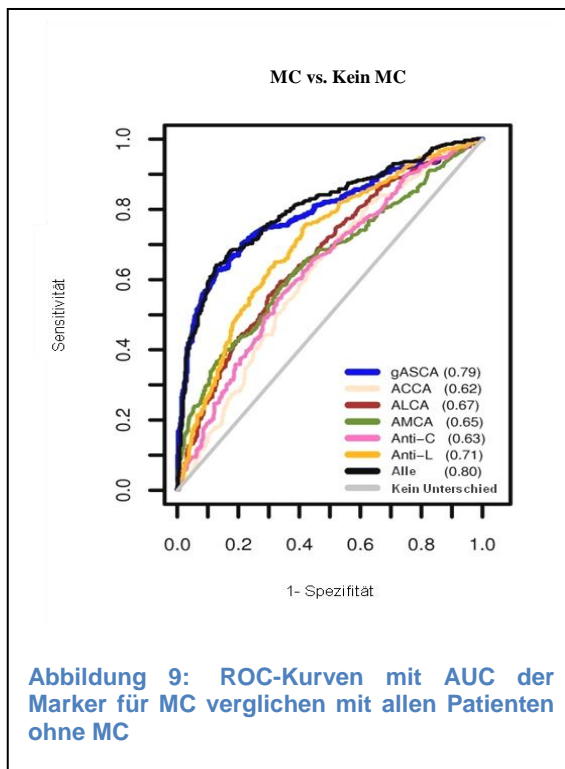
Werte der Marker (EU)	MC (N=363)	Kein MC (N=461)	P Wert
gASCA [MW] (P25, P75)	80.9 (29.5, 134.6)	19.2 (11.3, 35.3)	<0.001
ACCA [MW] (P25, P75)	50.7 (35.8, 70.9)	39.8 (27.9, 57.3)	<0.001
ALCA [MW] (P25, P75)	39.3 (24.0, 60.2)	25.1 (16.3, 40.3)	<0.001
AMCA [MW] (P25, P75)	64.8 (45.3, 103.9)	50.0 (38.6, 68.4)	<0.001
Anti-L [MW] (P25, P75)	71.0 (44.8, 120.1)	40.1 (27.5, 61.8)	<0.001
Anti-C [MW] (P25, P75)	34.2 (24.3, 50.0)	26.5 (19.2, 38.4)	<0.001

MW: Mittelwert und P25, P75: 25. und 75. Perzentile

Tabelle 6: Gemessene Titer der Anti-Glykan-Serumantikörper im Vergleich des Kollektives der MC-Patienten mit allen Patienten ohne MC

4.2 Wertigkeit der Serumantikörper

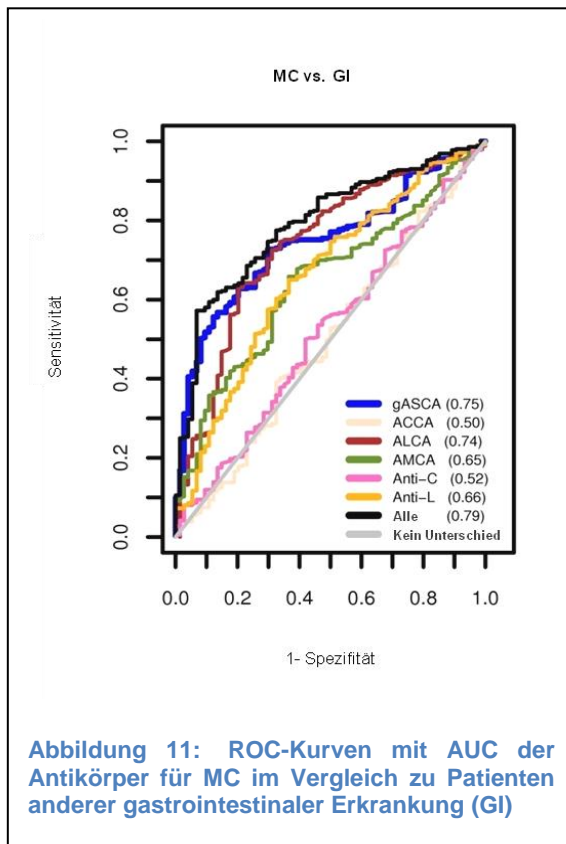
4.2.1 ROC-Kurven mit AUC der Marker



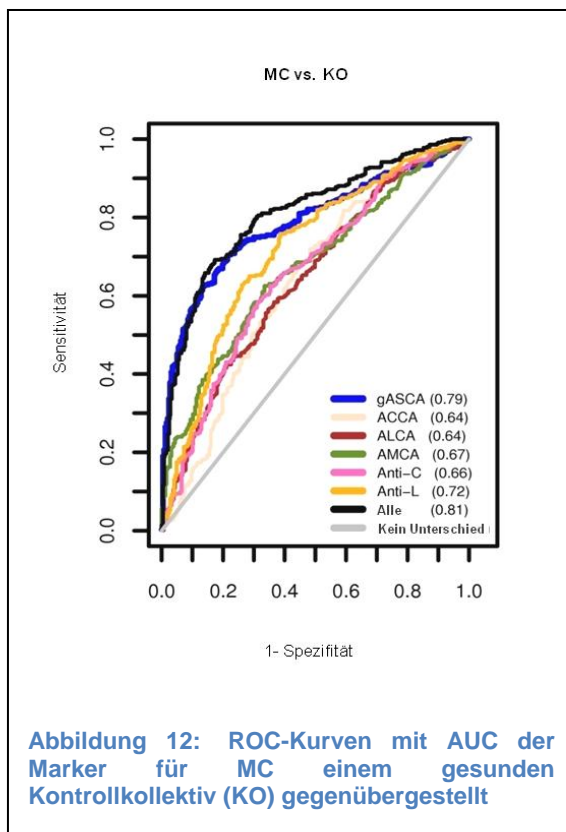
Zur Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit der getesteten Antikörper wurden vier verschiedene Voraussetzungen untersucht:

MC vs. Kein MC, MC vs. CU, MC vs. GI und MC vs. KO.

Zu diesem Zweck wurden Receiver Operating Characteristic- (ROC-) Kurven erstellt und die Area under the Curve- (AUC-) Werte wurden für jeden einzelnen Marker, alle Marker gemeinsam und auch für die Kombination aus gASCA, Anti-L und Anti-C, sowie für die Kombination aus gASCA, pANCA, Anti-L und Anti-C errechnet.



gASCA wies die **höchste diagnostische Genauigkeit als Einzelmarker** auf (AUC-Werte 0,75 - 0,82), wie in **Abbildung 9 bis 12** ersichtlich wird. Als ebenso wertvoller Einzelmarker erwies sich **Anti-L** mit AUC-Werten von 0,66 - 0,72. Die Kombination aller Anti-Glykan-Serumantikörper erhöhte die diagnostische Wertigkeit auf 0,79 - 0,84.



Den **Abbildungen 9 bis 12** können weiterhin alle ROC-Kurven der untersuchten Marker mit den dazugehörigen AUC-Werten, die in Klammern dargestellt sind, entnommen werden.

In der **gASCA** negativen Subgruppe zeigte das Antikörper Panel lediglich einen AUC von 0,57.

4.2.2 Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW

Basierend auf den angenommenen cut-off Werten wurden Sensitivität und Spezifität der Marker errechnet. In **Tabelle 7** werden sowohl Sensitivität und Spezifität, als auch positiver prädiktiver Wert (PPW) und negativ prädiktiver Wert (NPW) der Marker dargestellt – sowohl für die Unterscheidung von MC-Patienten gegenüber CU-Patienten als auch in der Abgrenzung von MC vs. KO, MC vs. GI und MC vs. Kein MC.

In Analogie zu den ROC-Kurven zeigt sich **gASCA** mit der **höchsten Sensitivität von 63,1%** als Einzelmarker je nach Vergleichsgruppe. Die Spezifität schwankt dabei zwischen 77,0 und 91,5 Prozent.

Bei der Unterscheidung von MC- und CU-Patienten kann die Positivität von gASCA, Anti-L und Anti-C bei gleichzeitiger Negativität von pANCA die Diagnose eines MC mit einer Spezifität von 100% stützen, jedoch unter Abfall der Sensitivität auf 11,2% bei einem PPW von 100% - wohingegen sich für die **Positivität von gASCA alleine bei Negativität von pANCA** eine **Sensitivität von 57,9%** bei einer **Spezifität von 94,8%** errechnet. Der **positiv prädiktive Wert** beträgt bei dieser Konstellation **97%**, der **negativ prädiktive Wert 43.5%**.

In der **Differentialdiagnose MC vs. CU** zeigt sich daher die Kombination aus **gASCA+/pANCA-** für MC und **gASCA-/pANCA+** für CU als bestes diagnostisches Mittel.

Marker	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPW (%)	NPW (%)
MC vs. Kein MC				
gASCA	63,1	85,2	77,1	74,6
ACCA	16,8	88,5	53,5	57,5
ALCA	25,6	90,2	67,4	60,6
AMCA	27,3	91,8	72,3	61,6
Anti-L	25,6	90,8	69,2	60,2
Anti-C	25,0	86,4	59,6	58,8
MC vs. CU				
gASCA	63,1	91,5	95,4	47,0
ACCA	16,8	93,1	87,1	28,6
ALCA	25,6	92,3	90,3	30,8
AMCA	27,3	93,1	91,7	31,4
Anti-L	25,6	92,7	91,1	30,0
Anti-C	25,0	89,5	87,4	29,1
pANCA neg.	89,7	39,7	81,3	56,8
gASCA+/pANCA-	57,9	94,8	97	43,5
gASCA+/pANCA- Anti-L+/Anti-C+	11,2	100	100	27,8
MC vs. GI				
gASCA	63,1	77,0	93,1	29,8
ACCA	16,8	79,7	80,3	16,3
ALCA	25,6	93,2	94,9	20,4
AMCA	27,3	91,9	94,3	20,5
Anti-L	25,6	89,2	92,0	19,8
Anti-C	25,0	77,0	84,1	17,4
MC vs. KO				
gASCA	63,1	84,4	85,1	61,8
ACCA	16,8	88,7	67,8	43,0
ALCA	25,6	88,3	75,6	45,7
AMCA	27,3	91,1	81,1	47,0
Anti-L	25,6	90,4	79,3	45,6
Anti-C	25,0	87,6	74,4	44,7

Tabelle 7: Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktiver Wert (PPW) und negativ prädiktiver Wert (NPW) der einzelnen Antikörper, jeweils für MC Patienten verglichen mit den verschiedenen Kontrollgruppen des Patientenkollektives

4.3 Ergebnisse bei Kombination der Serumantikörper

Die Kombination aus Anti-L, Anti-C und gASCA (AUC 0,81) verbesserte die Differenzierbarkeit von MC zu Kein MC signifikant ($p=0,0002$), verglichen mit gASCA alleine (AUC 0,79) – wie **Tabelle 8** veranschaulicht.

Marker	AUC (95% CI)
gASCA	0.79 (0.76, 0.82)
Anti-C	0.63 (0.59, 0.67)
Anti-L	0.71 (0.67, 0.74)
Anti-L/Anti-C	0.71 (0.67, 0.74)
gASCA/Anti-L/Anti-C	0.81 (0.77, 0.84)*

* $p=0.0002$ verglichen mit gASCA alleine

Tabelle 8: Diagnostische Wertigkeit bei Kombination der Marker gASCA, Anti-L und Anti-C für MC verglichen mit Kein MC

Tabelle 9 stellt dar, dass die Kombination aus gASCA/pANCA die höchste Diskriminationsfähigkeit für MC vs. CU (AUC 0,83) erreichte, und dass das Hinzuziehen von Anti-L und Anti-C zu gASCA/pANCA weiterhin die Diskrimination von MC zu CU ($p=0,006$) signifikant verbesserte, jedoch mit nur einem milden Anstieg der AUC (AUC 0,83 vs. 0,85).

Marker	AUC (95% CI)
gASCA	0.74 (0.70, 0.78)
pANCA	0.65 (0.60, 0.69)
gASCA/pANCA	0.83 (0.79, 0.87)*
gASCA/pANCA/ Anti-L/Anti-C	0.85 (0.81, 0.88)*

*Sowohl gASCA/pANCA als auch gASCA/pANCA/Anti-L/Anti-C sind besser als gASCA alleine ($p < 0.001$) und es ergibt sich ein signifikanter Unterschied für gASCA/pANCA vs. gASCA/pANCA/Anti-L/Anti-C ($p = 0.006$) bei jedoch großer Ähnlichkeit der AUC

Tabelle 9: Diagnostische Wertigkeit bei Kombination der Marker für MC verglichen mit CU

Das **Entfernen von gASCA** aus dem Panel **reduzierte die Diskriminationsfähigkeit** der Anti-Glykan-Serumantikörper deutlich (AUC 0,79 vs. 0,67; $p < 0,0001$), was noch einmal veranschaulicht, dass gASCA innerhalb der Diagnostik mithilfe der Anti-Glykan-Serumantikörper einen nicht zu ersetzenden Stellenwert besitzt.

Wie bereits zuvor dargestellt konnte in der gASCA negativen Subgruppe das Antikörper Panel lediglich einen AUC von 0,57 erreichen.

4.4 Verhalten der Anti-Glykan-Serumantikörper im zeitlichen Verlauf

Im Rahmen unserer Studie wurde weiterhin der zeitliche Verlauf des Anti-Glykan-Serumantikörper-Status untersucht. Von 363 MC-Patienten stellten 209 Patienten ihre Serumproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Verfügung. Ebenso wurden bei 45 von 130 Patienten mit CU Serumproben zu mehreren Zeitpunkten konserviert.

Interessanterweise zeigte der Großteil der untersuchten Patienten keine Veränderung im Verlauf der Erkrankung in der Ausprägung des Antikörpermusters im Bezug zur ersten Probenentnahme (siehe **Tabelle 10**).

Marker	Morbus Crohn (%)	Colitis ulcerosa (%)
gASCA		
Keine Veränderung	89,0	89,1
- zu +	4,3	8,7
+ zu -	6,7	2,2
ACCA		
Keine Veränderung	80,9	97,8
- zu +	10,5	0,0
+ zu -	8,6	2,2
ALCA		
Keine Veränderung	78,0	97,8
- zu +	11,5	0,0
+ zu -	10,5	2,2
AMCA		
Keine Veränderung	74,2	95,7
- zu +	10,1	2,2
+ zu -	15,8	2,2
Anti-L		
Keine Veränderung	77,8	90,7
- zu +	14,0	9,3
+ zu -	8,2	0,0
Anti-C		
Keine Veränderung	74,9	83,7
- zu +	7,7	7,0
+ zu -	17,4	9,3

Tabelle 10: Verhalten des Status der unterschiedlichen Serumantikörper im zeitlichen Verlauf der Erkrankung für MC Patienten und CU Patienten, die zu mehreren Zeitpunkten an der Studie teilnahmen

Für diese **MC-Patienten** ergibt sich eine **Konstanz von 89,0%** für die Ausbildung von **gASCA** im zeitlichen Verlauf der Untersuchung des Probandenkollektives. Für die weiteren untersuchten Marker ACCA, ALCA, AMCA, Anti-L und Anti-C ergeben sich Werte zwischen 74,2% und 80,9%.

Durchwegs höhere Werte zeigten sich im Probandenkollektiv mit **Colitis ulcerosa**, hier änderten **89,1%** der Patienten im Verlauf des Untersuchungszeitraumes ihre Expression von **gASCA** nicht, für ACCA, ALCA, AMCA, Anti-L und Anti-C lagen die ermittelten Werte zwischen 83,7% und sogar **bis zu 97,8%**.

Weder die **Aktivität der Erkrankung** – respektive die Unterschiede in der Krankheitsaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten – noch die **Dauer der Erkrankung** konnten die Expression des individuellen Antikörperprofils wesentlich beeinflussen.

Darüberhinaus kann aus der **Tabelle 10** abgelesen werden, in welchem Maße sich die Werte der Anti-Glykan-Serumantikörper von Negativität zu Positivität verändert haben (**- zu +**) bzw. inwiefern eine frühere Nachweisbarkeit eines der Marker im Verlauf verloren gegangen war (**+ zu -**).

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Kollektiv der **MC-Patienten** war zu **77% positiv für wenigstens einen der getesteten Anti-Glykan-Serumantikörper**. Die gemessenen Antikörpertiter waren bei den MC-Patienten signifikant erhöht gegenüber allen untersuchten Kontrollgruppen ($p < 0,001$).

gASCA wies mit AUC-Werten von 0,75 - 0,82 die **höchste diagnostische Genauigkeit als Einzelmarker** auf.

In der **Differentialdiagnose MC vs. CU** zeigte sich die Kombination aus **gASCA+/pANCA-** für **MC** und **gASCA-/pANCA+** für **CU** als bestes diagnostisches Mittel. Das Hinzuziehen von Anti-L und Anti-C zu

gASCA/pANCA verbesserte die Diskrimination von MC zu CU (AUC 0,83 vs. 0,85; $p=0,006$).

Die Kombination aus Anti-L, Anti-C und gASCA (AUC 0,81) verbesserte die Differenzierbarkeit von MC zu Kein MC ($p=0,002$), verglichen mit gASCA alleine (AUC 0,79). Das **Entfernen von gASCA** aus dem Panel **reduzierte die Diskriminationsfähigkeit** der Anti-Glykan-Serumantikörper (AUC 0,79 vs. 0,67; $p<0,0001$) signifikant.

Weiterhin kann dargestellt werden, dass auch ACCA, ALCA, AMCA, Anti-L und Anti-C hochspezifisch für einen Morbus Crohn sind, jedoch mit geringerer Sensitivität.

Es besteht eine hohe Marker Konstanz bei den von uns untersuchten **MC- und CU-Patienten von 89,0% bzw. 89,1%** für **gASCA** im zeitlichen Verlauf, mit ähnlich hohen Konstanzwerten für die weiteren untersuchten Marker ACCA, ALCA, AMCA, Anti-L und Anti-C. Damit besteht eine **dauerhaft stabile Nachweisbarkeit** der Anti-Glykan-Serumantikörper.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisse im Überblick

Dies ist die erste Studie, in deren Rahmen **die Kombination der neuen Anti-Glykan-Serumantikörper AMCA, ALCA, ACCA**, sowie **Anti-L** und **Anti-C** in Verbindung mit **gASCA** und **pANCA** auf ihre diagnostische Genauigkeit für chronisch entzündliche Darmerkrankungen untersucht wurden. Wir fanden eine signifikante Assoziation des Auftretens der untersuchten Marker mit Morbus Crohn verglichen mit Colitis ulcerosa und unseren weiteren Kontrollgruppen (GI und KO). Die getesteten Anti-Glykan-Serumantikörper können somit **zukünftig zur Diagnosestellung eines MC**, sowie zur Unterscheidung eines MC vs. CU oder MC vs. Kein MC beitragen und **so in diagnostisch unklaren Fällen eine Zuordnung zur zugrundeliegenden Erkrankung** ermöglichen.

5.2 Ergebnisse im Vergleich mit ähnlichen aktuellen Forschungen

Die von uns gefundenen Prävalenzen der Anti-Glykan-Serumantikörper (gASCA, ALCA, AMCA, ACCA) entsprechen auch den Ergebnissen vergleichbarer Veröffentlichungen. Ebenso erzielte die hier vorliegende Studie bezüglich der Werte für **Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktivem Wert (PPW) und negativ prädiktivem Wert (NPW)** ähnliche

Werte wie auch andere Autoren sie aktuell errechneten (63) (65) (86) (89) (90).

Aus **Tabelle 11** können unsere Ergebnisse im Vergleich mit den Forschungsergebnissen von **Ferrante et al. (86)** und **Simondi et al. (89)** entnommen werden, jeweils beispielhaft im Vergleich **MC vs. CU** für gASCA, ALCA, ACCA und AMCA für die Sensitivität, Spezifität, den positiv (PPW) und den negativ prädiktiven Wert (NPW).

MC vs. CU	Unsere Studie	Ferrante et al. (86)	Simondi et al. (89)
gASCA			
Sensitivität (%)	63,1	56,4	54,3
Spezifität (%)	91,5	90,4	88,7
PPW (%)	95,4	95,2	91,3
NPW (%)	47,0	38,2	47,0
ALCA			
Sensitivität (%)	25,6	17,7	25,0
Spezifität (%)	92,3	93,0	92,5
PPW (%)	90,3	89,5	87,9
NPW (%)	30,8	25,2	36,0
ACCA			
Sensitivität (%)	16,8	20,7	-
Spezifität (%)	93,1	84,9	-
PPW (%)	87,1	82,2	-
NPW (%)	28,6	24,2	-
AMCA			
Sensitivität (%)	27,3	28,1	-
Spezifität (%)	93,1	82,4	-
PPW (%)	91,7	84,3	-
NPW (%)	31,4	25,5	-

Tabelle 11: Vergleich von Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW für MC vs. CU für gASCA, ALCA, ACCA und AMCA in drei verschiedenen Studien.

5.3 Bedeutung der Ergebnisse für die diagnostischen Möglichkeiten

5.3.1 Differentialdiagnose MC vs. CU

In der **Differentialdiagnose MC vs. CU** stellt sich bisher die Kombination aus **ASCA+/pANCA-** für MC und **ASCA-/pANCA+** für CU als bestes diagnostisches Mittel dar (66) (71) (91). Dies konnte auch in unserer Studie belegt werden.

Allgemein gesprochen zeigt sich in der hier vorgelegten Arbeit **gASCA als der beste der untersuchten Einzelmarker** für die Diagnose eines MC in Abgrenzung zu CU. Die anderen von uns untersuchten **Serummarker ALCA, AMCA, ACCA**, ebenso wie **Anti-L und Anti-C**, zeigen zwar eine **hohe Spezifität** für **Morbus Crohn**, jedoch eine durchwegs **enttäuschend niedrige Sensitivität**. Unsere Studie stellt weiterhin dar, dass die Kombination aus **gASCA/pANCA** die höchste Diskriminationsfähigkeit für **MC vs. CU** (AUC 0,83) erreichte, und dass das **Hinzuziehen von Anti-L und Anti-C** zu gASCA/pANCA weiterhin die Diskrimination von MC zu CU ($p=0,006$) signifikant verbesserte, jedoch ohne die AUC-Werte sonderlich zu verändern (AUC 0,83 vs. 0,85). Eine weitere Kombination aus mehreren Anti-Glykan-Serumantikörpern, bis hin zur Kombination aller sechs Marker führte zu einer weiteren Verbesserung der Spezifität, jedoch zu einer Verschlechterung der Sensitivität, wie auch schon zuvor beschrieben wurde (63).

5.3.2 Differentialdiagnose MC vs. Kein MC

gASCA wies mit AUC-Werten von 0,75 - 0,82 die **höchste diagnostische Genauigkeit als Einzelmarker** auf. Das **Entfernen von gASCA** aus dem Panel **reduzierte die Diskriminationsfähigkeit** der Anti-Glykan-Serumantikörper (AUC 0,79 vs. 0,67; $p < 0,0001$) signifikant. Daher stellt gASCA den besten Einzelmarker zur Unterscheidung MC vs. GI oder MC vs. KO dar. Diese von uns erarbeiteten Ergebnisse decken sich mit dem aktuellen Stand der Forschung (62) (63) (65) (71) (86) (89) (91).

Obwohl auffiel, dass das Hinzuziehen von Anti-L und Anti-C zu gASCA als Einzelmarker die diagnostische Genauigkeit für MC vs. Kein MC signifikant erhöhte ($p = 0,0002$) war die Erhöhung der AUC auch in diesem Fall nur unmerklich (AUC 0,81 vs. 0,79) und ist daher klinisch von untergeordneter Bedeutung.

Auch bei der Konstellation MC vs. KO oder MC vs. GI und MC vs. Kein MC führte eine weitere Kombination aus mehreren Anti-Glykan-Serumantikörpern, bis hin zur Kombination aller sechs Marker, zu einer weiteren Verbesserung der Spezifität, jedoch zu einer Verschlechterung der Sensitivität, wie auch schon zuvor beschrieben wurde (63).

Zur Diagnose eines MC bzw. zur Unterscheidung MC vs. Kein MC bleibt also gASCA das wichtigste diagnostische Mittel im Bereich der Serummarker, eine weitere Kombination anderer Serummarker (AMCA, ALCA, ACCA, Anti-L und Anti-C) muss diagnostischen Spezialfällen vorbehalten bleiben.

5.4 Verlaufskonstanz der Marker

Erstmalig wurde im Rahmen unserer Studie auch eine detaillierte Analyse zur Erfassung der **zeitlichen Konstanz der Expression der Serummarker im Verlauf der Krankheitsdauer** durchgeführt, daher konnten von 209 Patienten mit Morbus Crohn Proben **zu unterschiedlichen Zeitpunkten** gewonnen werden. Weiterhin wurden bei 45 Teilnehmern mit Colitis ulcerosa Proben zu **mehreren Zeitpunkten** konserviert.

Weder Krankheitsdauer noch Krankheitsaktivität konnten das individuelle Antikörperprofil wesentlich beeinflussen. Trotz Schwankungen in der Markerhöhe zeigte sich eine erstaunliche Konstanz in der Expression des Markerstatus. Bei den von uns untersuchten **MC-Patienten** ergab sich eine hohe **Konstanz von 89,0%** für die Ausbildung von **gASCA** im zeitlichen Verlauf und für die weiteren untersuchten Marker ACCA, ALCA, AMCA, Anti-L und Anti-C ergaben sich Werte zwischen 74,2% und 80,9%. Noch etwas höhere Werte zeigten sich gar im Probandenkollektiv mit **Colitis ulcerosa**, hier änderten **89,1%** der Patienten im Verlauf des Untersuchungszeitraumes ihre Expression von **gASCA** nicht, für ACCA, ALCA, AMCA, Anti-L und Anti-C lagen die ermittelten Werte zwischen 83,7% und **97,8%**.

Dieses Wissen ist von großer Bedeutung, da Informationen über die Markerstabilität bisher noch sehr rar sind, jedoch gerade die **dauerhafte Nachweisbarkeit** der Anti-Glykan-Serumantikörper **Verlässlichkeit in den diagnostischen und differentialdiagnostischen Möglichkeiten** des getesteten Panels schafft. Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass

unabhängig von der Notwendigkeit einer Immunsuppression oder der Notwendigkeit einer Operation eine gewisse Verlässlichkeit in der Nachweisbarkeit bestimmter Serummarker besteht (80) (92). Eine andere Studie zeigte, dass auch bei Patienten vor der Diagnose eines MC bereits gASCA in bis zu 90% der Fälle nachweisbar sind (93). Andererseits fanden **Ferrante et al.** und **Arnott et al.**, dass die Ausbildung der Anti-Glykan-Serumantikörper mit längerer Krankheitsdauer nachlässt (49) (86).

5.5 Umsetzbarkeit der Ergebnisse im klinischen

Routinebetrieb

Die Routinebestimmung von Serummarkern hat bei CED bisher keinen Einzug in die tägliche klinische Praxis gefunden, was darin begründet liegt, dass der Großteil der betroffenen Patienten mit den herkömmlichen Standarddiagnoseverfahren eindeutig entweder dem Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa zuzuordnen ist (87). Bei einer Subgruppe von Patienten jedoch, hauptsächlich mit strikt kolonischem Befall und unklarem histologischen Befund, ist in 9-20% der Fälle nicht eindeutig differenzierbar, ob eine Colitis ulcerosa oder ein Morbus Crohn vorliegt. In diesem Fall erfolgt die Diagnose einer eigenen Entität, die meist als **Colitis indeterminata** (CI) bezeichnet wird (50) (51) (52). Gerade für diese Fälle kann es sinnvoll sein, mittels der von uns getesteten Anti-Glykan-Serumantikörper eine Komplettierung der klinischen Diagnostik anzustreben, da die getesteten Marker eine **hohe Diskriminationsfähigkeit für MC im Vergleich zu CU**,

KO oder GI zeigen und somit eine **Diskrimination zwischen CU und MC** auch in unklaren Fällen zu erreichen.

5.6 Einschränkungen

Alle in die Studie eingeschlossenen Probanden mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa entstammen einem einzigen Referenzzentrum für chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Daher müssen Limitationen bezüglich des Patientengutes in Betracht gezogen werden, die sich auf die Vorselektierung des Patientengutes beziehen. Im Vergleich mit einem Normalkollektiv handelt es sich sicherlich um ein Kollektiv mit erhöhter Notwendigkeit therapeutischer Interventionen und längerer Krankheitsdauer, sowie chronisch-aktiven Verläufen.

Die im Kollektiv vorherrschende hohe Prävalenz von MC führt zwangsweise zu einer konsekutiven Beeinflussung des PPW und des NPW.

Außerdem erfolgte die erste Probenentnahme meist nah zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Bei den darauf folgenden Besuchen wurden die Proben ohne Korrelation zur Krankheitsaktivität oder Therapie rein willkürlich entnommen, was zur Selektierung von schwereren Verlaufsformen geführt haben könnte.

5.7 Ausblick

Diese Studie hat zweifelsohne vielversprechende Ergebnisse zu Tage gefördert, die einmal mehr die Notwendigkeit weiterführender prospektiver Studien auf dem Gebiet der Anti-Glykan-Serumantikörper und deren Bedeutung für die Diagnose und Differentialdiagnose von CED aufzeigen.

Gerade für die Frage der **Diskriminationsfähigkeit für MC im Vergleich zu CU, KO oder GI**, die eine **Diskrimination zwischen CU und MC auch in unklaren Fällen** erreichen ließe, ist eine weitergehende Forschung zur Bestätigung unserer Ergebnisse in einer zweiten Kohorte erstrebenswert.

Da es nach wie vor keine prospektiven Studien zur Frage der Diagnose und Differentialdiagnose der CED mithilfe von Anti-Glykan-Serumantikörpern gibt, kann die hier vorliegende Studie gerade die Notwendigkeit einer solchen zukünftigen Untersuchung unterstreichen.

6 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen stellen klinisch ein heterogenes Krankheitsbild dar. In etwa **10% der Fälle** ist eine **Unterscheidung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nicht möglich**. Die Diagnose einer CED fußt regelhaft auf klinischen, radiologischen, endoskopischen und histopathologischen Kriterien, wie von Stange et al. gefordert (87).

Wir haben daher **neue Anti-Glykan-Serumantikörper** – darunter die bisher unbekannten Marker Anti-L und Anti-C – zur **Diagnose und Differentialdiagnose von CED** untersucht. Zur Durchführung der Studie wurden insgesamt **1439 Serumproben** von **824 Probanden** analysiert. Davon stammten 895 Proben von **363 Patienten mit Morbus Crohn** und weitere 213 Proben von **130 Patienten mit Colitis ulcerosa**. Weitere **257 Proben** entstammen **Probanden ohne gastrointestinaler Erkrankung** und wurden dem Kontrollkollektiv (**KO**) zugeteilt. Des Weiteren wurden Serumproben von **74 Patienten mit anderer gastrointestinaler Erkrankung (GI)** als CED getestet.

Die Seren dieser 824 Patienten des „Kompetenznetz CED“ wurden geblindet auf das Vorhandensein von Anti-Chitobiosid IgA Carbohydrat Antikörper (**ACCA**), Anti-Laminaribiosid IgG Carbohydrat Antikörper (**ALCA**), Anti-Mannobiosid IgG Carbohydrat Antikörper (**AMCA**), Anti-Saccharomyces cerevisiae IgG Antikörper (**gASCA**), sowie Anti-Laminarin IgA Carbohydrat Antikörper (**Anti-L**) und Anti-Chitin IgA Carbohydrat Antikörper (**Anti-C**)

mittels ELISA (Glycominds Ltd., Lod, Israel) sowie auf **pANCA** mittels IFA (Glycominds Ltd., Lod, Israel) untersucht. Vollständige klinische Daten aller CED-Patienten – darunter klinischer Untersuchungsbefund, radiologische, endoskopische und histopathologische Ergebnisse – waren zur Auswertung verfügbar. Die Ergebnisse wurden mittels **SAS Software Version 9.1** (The SAS Institute, Cary, NC, USA) und die **Software R Version 2.4.1** (The R Institute for Statistical Computing, Wien, Österreich) analysiert.

Das Kollektiv der **MC-Patienten** war zu **77% positiv für wenigstens einen der getesteten Anti-Glykan-Serumantikörper**. Die gemessenen Antikörpertiter waren bei MC signifikant erhöht gegenüber den Kontrollgruppen ($p < 0,001$). **gASCA** wies mit AUC-Werten von 0,75 - 0,82 je nach Kontrollgruppe die **höchste diagnostische Genauigkeit als Einzelmarker** auf. In der **Differentialdiagnose MC vs. CU** zeigte sich die Kombination aus **gASCA+/pANCA-** für MC und **gASCA-/pANCA+** für CU weiterhin als bestes diagnostisches Mittel, wie auch von anderen Autoren gefunden (66) (91). Das Hinzuziehen von Anti-L und Anti-C zu gASCA/pANCA verbesserte die Diskrimination von MC zu CU (AUC 0,83 vs. 0,85; $p = 0,006$).

Die Kombination aus Anti-L, Anti-C und gASCA (AUC 0,81) verbesserte die Differenzierbarkeit von MC zu Kein MC ($p = 0,002$), verglichen mit gASCA alleine (AUC 0,79). Das **Entfernen von gASCA** aus dem Panel **reduzierte die Diskriminationsfähigkeit** der Anti-Glykan-Serumantikörper (AUC 0,79 vs. 0,67; $p < 0,0001$) signifikant.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die getesteten Marker eine **hohe Diskriminationsfähigkeit für MC im Vergleich zu CU, KO oder GI** zeigen. Der **beste einzelne Antikörper ist gASCA**. Elimination von gASCA aus dem diagnostischen Panel verschlechtert die Diskriminationsfähigkeit signifikant. Die getesteten Anti-Glykan-Serumantikörper AMCA, ALCA, ACCA und gASCA in Kombination mit pANCA, sowie mit Anti-L und Anti-C können **zukünftig zur Diagnosestellung eines MC**, sowie zur Unterscheidung eines MC vs. CU oder MC vs. Kein MC beitragen und damit **in diagnostisch unklaren Fällen eine Zuordnung zur zugrundeliegenden Erkrankung** ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

1. **Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD.** Regional enteritis: A pathological and clinical entity. *The Journal of the American Medical Association* 1932;99:1323-9.
2. **Wilks S.** Morbid appearances in the intestines of Miss Banks. *Medical times and gazette* 1859;2:264-5.
3. **Siegmund B, Zeitz M.** Aktuelle Therapie und Diagnostik des Morbus Crohn. *Gastroenterologie up2date* 2007;3:199-213.
4. **Eibl-Eibesfeldt B.** Chirurgische Behandlungsstrategien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Kliniker* 2004;33:212-9.
5. **Hanauer SB.** Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med* 1996;334:841-8.
6. **Haug K, Schrumpf E, Halvorsen JF, Fluge G, Hamre E, Hamre T, Skjollingstad R.** Epidemiology of Crohn's disease in western Norway. *Scand J Gastroenterol* 1989;24:1271-5.
7. **Kornbluth A, Sachar DB, Salomon P.** Crohn's Disease. [Hrsg.] Schaschmidt BF, Sleisenger MH, Feldman M. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 6th Edition. Philadelphia, London, Toronto, Montreal : Saunders Company, 1998, S. 1708-34.
8. **Aldhous MC, Satsangi J.** Genetics of inflammatory bowel disease. [Hrsg.] Lochs H, Stange EF, Dignass A. *Trends and Controversies in IBD* -

Evidence-Based Approach or individual Management? Dordrecht, Boston, London : Kluwer Academic Publishers, 2004, S. 3-17.

9. **Timmer A.** Epidemiologie CED. [Hrsg.] Kroesen AJ, Klump B, Hoffmann JC. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*. Stuttgart : Thieme, 2004, S. 8-21.

10. **Mpofu CM, Campbell BJ, Subramanian S, Marshall-Clarke S, Hart CA, Cross A, Roberts CL, McGoldrick A, Edwards SW, Rhodes JM.** Microbial mannan inhibits bacterial killing by macrophages: a possible pathogenic mechanism for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2007;133(5):1487-98.

11. **Van Limbergen J, Russel RK, Nimmo ER, Satsangi J.** The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1-12.

12. **Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B.** Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29(7):990-6.

13. **Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ.** Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996;312(7023):95-6.

14. **Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO.** Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*;35(10):1075-81.

15. **Jaghanti V, Probert CSJ, Mayberry JF.** Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Q-J-M* 1991;78:5-12.

16. **Rodríguez-Bores L, Lonseca GCF, Villeda MA, Yamamoto-Furusho JK.** Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13(42):5560-70.
17. **Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza M, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson A, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones J, Foelsch U, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew C.** Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-8.
18. **Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK.** Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13(42):5577-80.
19. **Kullberg BJ, Ferwerda G, de Jong DJ, Drenth JPH, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netha MG.** Crohn's disease patients homozygous for the 3020insC NOD2 mutation have a defective NOD2/TLR4 cross-tolerance to intestinal stimuli. *Immunology* 2007;123:600-5.
20. **Hugot JP, Chamaillard M, Zoulali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G.** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
21. **Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JPA.** Differential effects of NOD 2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse population: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2393-2404.

22. **von Herbay A, Krekeler GR, Riede UN.** Digestorisches System. [Hrsg.] Werner M, Schäfer HE Riede UN. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Auflage. Stuttgart : Thieme, 2004, S. 649-734.
23. **Braegger CP, MacDonald TT.** Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1994;72(2):135-41.
24. **Elsasser-Beile U, von Kleist S, Gerlach S, Gallati H, Monting JS.** Cytokine production in whole blood cell cultures of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Lab Anal* 1994;8(6):447-51.
25. **Podolsky DK.** Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-29.
26. **Cummings JH, MacFarlane GT.** Is there a role for microorganisms? [Hrsg.] Warren BF, Mortensen NJ, Jewell DP. *Challenges in Inflammatory Bowel Disease*. London, Berlin, Tokyo, Ames : Blackwell Science, 2001, S. 42-51.
27. **Rogler G, Andus T.** Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998;22:382-9.
28. **Schreiber S, Heinig T, Thiele HG.** Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108:1434-44.
29. **Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F.** Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995;154:2434-40.

30. **Fiocchi C.** Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1996;115:182–205.
31. **Greenwald BD, Stephen PJ.** Immunology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1997;13:293-301.
32. **Caspary WF, Wehrmann T.** Dünn- und Dickdarm. [Hrsg.] Greten H. *Innere Medizin*. 12. Auflage. Stuttgart : Thieme, 2005, S. 697-767.
33. **Shanahan R.** Pathogenesis of ulcerative colitis. *Lancet* 1993;342:407-11.
34. **Podolsky DK.** Inflammatory bowel disease (Part1). *N Engl J Med* 1991;325:928-37.
35. **Podolsky DK.** Inflammatory Bowel Disease (Part2). *N Engl J Med* 1991;325:1008-16.
36. **Raible A, Graepler F.** Endoskopie. [Hrsg.] Kroesen AJ, Klump B Hoffmann JC. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*. Stuttgart : Thieme, 2004, S. 102-09.
37. **Paspatis GA, Millar A, Chlouverakis Gj, Jamieson CP, Swain CP.** Interobserver variation in describing endoscopic features in inflammatory bowel disease using videotapes of colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 2000;95(5):1376-7.
38. **Rao SS, Holdsworth CD, Read NW.** Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1988;29:342-5.
39. **Wright JP, Young GO, Tigler-Wybrandi N.** Predictors of acute relapse of Crohn's disease. A laboratory and clinical study. *Dig Dis Sci* 1987;32:164-70.

40. **De Boer Visser J, Bryant H, Hershfield NB.** Predictors of hospitalization early in the course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;99:380-5.
41. **Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M.** Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;99:956-63.
42. **Spiliadis CA, Lennard-Jones JE.** Ulcerative colitis with relative sparing of the rectum. Clinical features, histology, and prognosis. *Dis Colon Rectum* 1987;30:334-6.
43. **Munkholm P.** Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther Suppl* 2003;2:1-5.
44. **Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N.** The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1116-22.
45. **Ricart E, Panaccione R, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ.** Autoimmune disorders and extraintestinal manifestations in first-degree familial and sporadic inflammatory bowel disease: a case-control study. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:207-14.
46. **Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF.** The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2005;129:827-36.

47. **Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR.** Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006;12(30):4819-31.
48. **Schölmerich J, Warren B.** Differential Diagnosis and Other Forms of Inflammatory Bowel Disease. [Hrsg.] Satsangi J, Sutherland LR. *Inflammatory Bowel Diseases*. London, Philadelphia : Churchill Livingstone (Elsevier Limited), 2003, S. 199-216.
49. **Arnott IDR, Landers CJ, Nimmo EJ, Drummond HE, Smith BKR, Targan SR, Satsangi J.** Sero-Reactivity to Microbial Components in Crohn's Disease is Associated with Disease Severity and Progression but not NOD2/CARD15 Genotype. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2376-84.
50. **Price AB.** Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease – 'colitis indeterminate'. *J Clin Pathol* 1978;31:567–77.
51. **Lee KS, Medline A, Shockey S.** Indeterminate colitis in the spectrum of inflammatory bowel disease. *Arch Pathol Lab Med* 1979;103:173–6.
52. **Farmer M, Petras RE, Hunt LE, Janosky JE, Galanduik S.** The importance of diagnostic accuracy in colonic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3184–8.
53. **Mitchell PJ, Rabau MY, Haboubi NY.** Indeterminate colitis . *Tech Coloproctol* 2007;11:91–6.
54. **Seibold F.** Autoantikörperdiagnostik. [Hrsg.] Dignass A, Stein J. *Gastroenterologie update 2001 - Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*. Berlin, Heidelberg : Springer, 2001, S. 103-9.

55. **Broberger O, Perlmann P.** Autoantibodies in human ulcerative colitis. *J Exp Med* 1959;110:657-74.
56. **Klebl FH, Bataille F, Berteau CR, Herfarth H, Hofstädter F, Schölmerich J, Rogler G.** Association of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies with Vienna classification subtypes of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9(5):302-7.
57. **Rump JA, Schölmerich J, Gross V.** A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmatic antibody in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Immunobiology* 1990;181:406-13.
58. **Saxon A, Shanahan F, Landers C.** A distinct subset of antineutrophil cytoplasmatic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:202-10.
59. **Peyrin-Biroulet L, Standaert-Vitse A, Branche J, MD, Chamaillard M.** IBD Serological Panels: Facts and Perspectives. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1561-6.
60. **Seibold F, Brandwein S, Simpson S, Terhorst C, Elson CO.** pANCA Represents a Cross-Reactivity to Enteric Bacterial Antigens. *J Clin Immunol* 1998;18(2):153-60.
61. **Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, Rotter JI, Vidrich A, Targan SR.** Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996;110(6):1810-9.

62. **Main J, McKenzie H, Yeaman GR, Kerr MA, Robson D, Pennington CR, Parratt D.** Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 1988;297(6656):1105-6.
63. **Dotan I, Fishman S, Dgani Y, Schwartz M, Karban A, Lerner A, Weishauss O, Spector L, Shtevi A, Alstock RT, Dotan N, Halpern Z.** Antibodies Against Laminaribioside and Chitobioside Are Novel Serologic Markers in Crohn's Disease. *Gastroenterology* 2006;131:366-78.
64. **Mokrowiecka A, Gasiorowska A, Malecka-Panas E.** pANCA and ASCA in the Diagnosis of Different Subtypes of Inflammatory Bowel Disease. *Hepatogastroenterology* 2007;54:1443-8.
65. **Klebl FH, Bataille F, Hofstädter F, Herfarth H, Schölmerich J, Rogler G.** Optimising the diagnostic value of anti-*Saccharomyces cerevisiae*-antibodies (ASCA) in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2004;19(4):319-24.
66. **Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P.** Diagnostic value of anti-*Saccharomyces cerevisiae* and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:730-4.
67. **Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, Cortot A, Grandbastien B, Charrier G, Targan SR, Colombel JF, Poulain D.** Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998;42(6):788-91.

68. **Seibold F, Stich O, Hufnagl R, Kamil S, Scheurlen M.** Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in inflammatory bowel disease: a family study. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:196-201.
69. **Linskens RK, Mallant-Hent RC, Groothuismink ZM, Bakker-Jonges LE, van de Merwe JP, Hooijkaas H, von Blomberg BM, Meuwissen SG.** Evaluation of serological markers to differentiate between ulcerative colitis and Crohn's disease: pANCA, ASCA and agglutinating antibodies to anaerobic coccoid rods. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1013-8.
70. **Sandborn WJ, Loftus EV Jr, Colombel JF, Fleming KA, Seibold F, Homburger HA, Sendid B, Chapman RW, Tremaine WJ, Kaul DK, Wallace J, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Targan SR.** Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:192-201.
71. **Bossuyt X.** Serologic Markers in Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Chemistry*. 2006;52(2):171-81.
72. **Steinhart AH.** Blood tests in IBD: which are necessary? [Hrsg.] Bernstein CN. *The Inflammatory Bowel Disease Yearbook*. Volume 3. London, Chicago : Remedica, 2006.
73. **Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Stöcker K, Jantschek G.** Autoantikörper gegen exokrines Pankreas und gegen intestinale Becherzellen in der Diagnostik des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa. *Dtsch Med Wochenschr* 1984;109:1963-9.

74. **Seibold F, Mörk H, Tanza S, Müller A, Holzhüter C, Weber P, Scheurlen M.** Pancreatic autoantibodies in Crohn's disease: a family study. *Gut* 1997;40(4):481-4.
75. **Joossens S, Vermeire S, Van Steen K, Godefroidis G, Claessens G, Pierik M, Vlietinck R, Aerts R, Rutgeerts P, Bossuyt X.** Pancreatic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(6):771-7.
76. **Klebl FH, Bataille F, Huy C, Hofstädter F, Schölmerich J, Rogler G.** Association of antibodies to exocrine pancreas with subtypes of Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17(1):37-9.
77. **Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J, Targan SR.** Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002;123(3):689-99.
78. **Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR, Braun J.** Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000;119(1):23-31.
79. **Devlin SM, Dubinsky MC.** Determination of Serologic and Genetic Markers Aid in the Determination of the Clinical Course and Severity of Patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(1):125-8.
80. **Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Cong Y, Papadakis KA, Vasilias E, Elson CO, Hershberg RM.** Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128(7):2020-8.

81. **Xue S, Stempak JM, Elkadri AA.** Serological markers are associated with severity of disease and need for surgery in IBD patients. *Gastroenterology* 2006;130:1303.
82. **Mow WS, Vasiliasauskas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, Landers CJ, Abreu-Martin MT, Rotter JI, Yang H, Targan SR.** Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004, 126(2), S. 414-24.
83. **Amre DK, Lu SE, Costea F, Seidman EG.** Utility of Serological Markers in Predicting the Early Occurrence of Complications and Surgery in Pediatric Crohn's Disease Patients. *Am J Gastroenterol* 2006;101:645–52.
84. **Dubinsky MC, Lin YC, Dutridge D, Picornell Y, Landers C, Farrior S, Wrobel I, Quiros A, Vasiliasauskas E, Grill B, Israel D, Bahar R, Christie D, Wahbeh G, Silber G, Dallazadeh S, Shah P, Thomas D, Kelts D, Hersh R, Elson C, Tar S, Taylor K, Rotter J, Yang H.** Serum Immune Responses Predict Rapid Disease Progression among Children with Crohn's Disease: Immune Responses Predict Disease Progression. *Am J Gastroenterol* 2006;101:360–7.
85. **Spivak J, Landers JC, Vasiliasauskas EA, Abreu MT, Dubinsky MC, Papadakis KA, Ippoliti A, Targan SR, Fleshner PR.** Antibodies to I2 Predict Clinical Response to Fecal Diversion in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1122-30.
86. **Ferrante M, Henckaerts L, Joosens M, Pierik M, Joosens S, Dotan N, Norman GL, Altstock RT, Van Steen K, Rutgeerts P, Van Assche G,**

Vermiere S. New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* 2006;56:1394-1403.

87. **Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Schölmerich J, Reinisch W.** European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006;55: Suppl 1:i1-15.

88. **DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL.** Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837-845.

89. **Simondi D, Mengozzi G, Betteto S, Bonardi R, Ghignone RP, Fagoonee S, Pellicano R, Sguazzini C, Pagni R, Rizzetto M, Astegiano M.** Antiglycan antibodies as serological markers in the differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(5):645-51.

90. **Papp M, Altorjay I, Dotan N, Palatka K, Foldi I, Tumpek J, Sipka S, Udvardy M, Dinya T, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Tulassay Z, Miheller P, Norman GL, Szamosi T, Papp J und Hungarian IBD Study Group, Lakatos PL.** New serological markers for inflammatory bowel disease are associated with earlier age at onset, complicated disease behavior, risk for surgery, and NOD2/CARD15 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Am J Gastroenterol* 2008;103(3):665-81.

91. **Koutroubakis IE, Petinaki E, Mouzas IA, Vlachonikolis IG, Anagnostopoulou E, Castanas E, Maniatis AN, Kouroumalis EA.** Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies and antineutrophil

cytoplasmic autoantibodies in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96(2):449-54.

92. **Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J, Targan SR.** Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002;123(3):689-99.

93. **Israeli E, Grotto I, Gilburd B, Balicer RD, Goldin E, Wiik A, Shoenfeld Y.** Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut* 2005;54(9):1232-6.

8 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

8.1 113. Kongress der DGIM 2007

- ❖ **Der neue Anti-Glykan-Serumantikörper ACCA in Kombination mit gASCA ist mit einem aktiven und komplizierten Verlauf des Morbus Crohn assoziiert**

A. Wolf, **S. Schleder**, A. Dirmeier, M. Gruengard, U. Strauch, F. Obermeier, B. Salzberger, G. Rogler, N. Dotan, F. Rieder, F. Klebl (Regensburg; Lod, Israel), **Poster 417**, 14.-18. April 2007, Wiesbaden

- ❖ **Die neuen Anti-Glykan-Serumantikörper AMCA, ALCA, ACCA und gASCA in Verbindung mit pANCA erleichtern die Diagnose und Differenzierung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

S. Schleder, A. Wolf, A. Dirmeier, M. Gruengard, U. Strauch, F. Obermeier, B. Salzberger, G. Rogler, N. Dotan, F. Klebl, F. Rieder (Regensburg; Lod, Israel), **Poster 419**, 14.-18. April 2007, Wiesbaden

8.2 115. Kongress der DGIM 2009

- ❖ **Neue Anti-Glykan-Serumantikörper sind mit einem komplizierten Verlauf des Morbus Crohn assoziiert**

A. Wolf, **S. Schleder**, A. Dirmeier, U. Strauch, F. Obermeier, R. Lopez, L. Spector, E. Fire, J. Yarden, G. Rogler, N. Dotan, F. Rieder, F. Klebl (Regensburg; Cleveland, USA; Lod, Israel; Zürich, Schweiz), **Poster 83**, 18.-22. April 2009, Wiesbaden

❖ **Neue Anti-Glykan-Serumantikörper erleichtern die Diagnose und Differenzialdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

S. Schleder, A. Wolf, A. Dirmeier, U. Strauch, F. Obermeier, R. Lopez, L. Spector, E. Fire, J. Yarden, G. Rogler, N. Dotan, F. Rieder, F. Klebl
(Regensburg; Cleveland, USA; Lod, Israel; Zürich, Schweiz), **Poster 86**,
18.-22. April 2009, Wiesbaden

8.3 Veröffentlichungen

- ❖ Rieder F, **Schleder S**, Wolf A, Dirmeier A, Strauch U, Obermeier F, Lopez R, Spector L, Fire E, Yarden J, Rogler G, Dotan N, Klebl F

Association of the novel serologic anti-glycan antibodies anti-laminarin and anti-chitin with complicated Crohn's disease behavior
Inflamm Bowel Dis 2010;16(2):263-7.

- ❖ Rieder F, **Schleder S**, Wolf A, Kamm, F, Dirmeier A, Strauch U, Obermeier F, Lopez R, Achkar JP, Rogler G, Klebl F

C-reactive protein and hemoglobin predict complicated Crohn's disease behavior – a cohort study
Scand J Gastroenterol – **submitted**

- ❖ Rieder F, **Schleder S**, Wolf A, Dirmeier A, Strauch U, Obermeier F, Lopez R, Spector L, Fire E, Yarden J, Rogler G, Dotan N, Klebl F

Serum anti-glycan antibodies predict complicated Crohn's disease behavior: A cohort study
Inflamm Bowel Dis 2009 Dec 18 – **Epub**

9 Danksagung

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Leute beigetragen, denen ich allen großen Dank schulde. Sei es durch eine großzügige Förderung meiner Arbeit, die Anleitung, die Betreuung, die Einweisung in neue Arbeitstechniken, die Unterstützung im Labor, das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit oder das außerordentlich gute Arbeitsklima.

Mein Dank gilt Herrn **Prof. Dr. J. Schölmerich**, der mir als Direktor der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit sowie zur Teilnahme an den Kongressen der DGIM gegeben hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **PD Dr. F. Klebl** für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und für die Freiheit, eigene Ideen mit einbringen zu dürfen. Seine zahlreichen Anregungen und die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Leitung dieser Arbeit waren eine sehr wichtige Hilfe und eine wertvolle Erfahrung.

Mein ganz spezieller Dank geht besonders an Herrn **Dr. F. Rieder**. Die immerwährende Bereitschaft Fragen auszuräumen und außerdem die Aufmunterungen bei Schwierigkeiten waren beeindruckend. Er war mir immer eine große Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und insbesondere bei der Erstellung der Kongressbeiträge.

Ich danke den Kolleginnen und Kollegen Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg für die Unterstützung bei den Blutentnahmen und besonders Frau **Andrea Dirmeier** für Ihre immerwährend freundliche Hilfestellung bei der Bearbeitung der Proben und bei der großen Hilfestellung bei der Aufbereitung der Proben zum Versand.

Außerdem gebührt mein Dank meinen Mitstreitern aus der gemeinsamen Arbeitsgruppe, **Alexandra Wolf** und **Florian Kamm**, die ebenfalls großen Beitrag zum Gelingen meiner Arbeit geleistet haben, und mit denen ich die ein oder andere arbeitsame Stunde geteilt habe.

Mein bester Dank jedoch gilt vor allem **meinen Eltern**, die mir durch ihre immerwährende Unterstützung diese Ausbildung überhaupt erst ermöglicht haben – und die ein oder andere schlechte Laune meinerseits ertragen mussten...

Und **Martina**, Danke dafür, dass es dich in meinem Leben gibt!

Zuletzt, aber nicht an letzter Stelle, gilt nun mein Dank **allen denen, die es verdient haben**, die ich aber leider vergessen habe hier zu nennen.

VIELEN DANK!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stephan Christian Schleder
Geburtsdatum	01.08.1982
Geburtsort	Simbach am Inn
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch

Schul Ausbildung

9/1989 – 6/2002	Grundschule und Gymnasium in Pocking; Abschluss Abitur, Note 1,5
-----------------	---

Zivildienst

9/2002 – 6/2003	Waldburg-Zeil Klinik Ndb., Bad Füssing
-----------------	--

Hochschulausbildung

2003 – 2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
10/2005	Erste Ärztliche Prüfung, Note „gut“
11/2009	Zweite Ärztliche Prüfung, Note „gut“

Famulaturen

2/2006 – 3/2006	Dr. Ulrych, Innere Medizin, St. Barbara KH Schwandorf
2/2007 – 3/2007	Prof. Dr. Schmitz, Anästhesiologie, Caritas KH St. Josef, Regensburg
3/2007	Prof. Dr. Klein, Psychiatrie, Bezirkskrankenhaus, Regensburg
7/2007 – 8/2007	Prof. Dr. Schölmerich, Innere Medizin, Uniklinik Regensburg
2/2008 – 3/2008	Prof. Dr. Feuerbach, Radiologie, Uniklinik Regensburg
3/2008 – 4/2008	Dr. Kunze, Allgemeinmedizin, Schöllnach

Praktisches Jahr

08/2008 – 12/2008	Prof. Dr. Feuerbach, Radiologie, Uniklinik Regensburg und Dr. Petralli / PD Dr. Hügli, Radiologie, Kantonsspital Bruderholz (CH)
12/2008 – 04/2009	Prof. Dr. Riegger, Innere Medizin, Uniklinik Regensburg und Prof. Dr. Schölmerich, Innere Medizin, Uniklinik Regensburg und Prof. Dr. Fleck, Innere Medizin, Asklepios Klinik Bad Abbach

04/2009 – 07/2009

Prof. Dr. Grimm, Chirurgie, Klinikum
Passau und

Dr. Obernhuber, Chirurgie, Klinikum
Passau

Berufliche Stationen

seit 01/2010

Dr. Rock, Radiologie, Klinikum Deggendorf

Besondere Kenntnisse

Sprachen

Englisch, sicher in Wort und Schrift

Französisch, Schulkenntnisse

EDV

Sicherer Umgang mit Microsoft Word, Excel
und Powerpoint

Hobbys

Golf, Skifahren, Joggen, Lesen

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 10. Juni 2010

(Stephan Schleder)